

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 875**

51 Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04711116 .6**
96 Fecha de presentación: **13.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1596828**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Vehículo de administración de fármacos lipofílicos y métodos de utilización del mismo**

30 Prioridad:
14.02.2003 US 447508 P
01.10.2003 US 508035 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.03.2012

73 Titular/es:
**CHILDREN'S HOSPITAL & RESEARCH CENTER
AT OAKLAND
5700 MARTIN LUTHER KING JR. WAY
OAKLAND, CA 94609, US**

72 Inventor/es:
**RYAN, Robert, O. y
ODA, Michael, N.**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 376 875 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

Vehículo de administración de fármacos lipofílicos y métodos de utilización del mismo

5 Campo de la invención

Esta solicitud se relaciona con composiciones y métodos para la administración de agentes bioactivos. En particular, la solicitud se relaciona con partículas para administración de agentes bioactivos que incluyen un polipéptido de unión a lípidos, una bicapa lipídica y un agente bioactivo.

10

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes de Patentes Provisionales EE.UU. N^{os} de Serie 60/447.508, depositada el 14 de Febrero de 2003, y 60/508.035, depositada el 1 de Octubre de 2003.

15

Declaración concerniente a investigación o desarrollo de financiación federal

Esta invención fue realizada en parte durante el trabajo respaldado por la subvención N^o HL65159 de los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

20

Antecedentes de la invención

Substancias bioactivas tales como agentes terapéuticos, inmunógenos vacunales y nutrientes no pueden ser con frecuencia administradas en forma pura, sino que deben ser incorporadas a formulaciones biocompatibles que aumentan la solubilidad del material bioactivo y lo envasan en una forma adecuada para conseguir efectos beneficiosos óptimos minimizando al mismo tiempo los efectos colaterales no deseables. Una administración eficiente de agentes bioactivos se ve frecuentemente dificultada por un corto tiempo de aclaramiento de un agente en el organismo, un envío dirigido ineficazmente a un sitio de acción o la naturaleza del propio agente bioactivo, por ejemplo una pobre solubilidad en medios acuosos o hidrofobicidad. Así, se han desarrollado muchas estrategias de formulación para mejorar la administración, incluyendo formulaciones de liberación controlada, emulsiones y preparaciones liposomales.

25

30

Se han descrito sistemas farmacéuticos de administración liposomales. Los liposomas son membranas de bicapa lipídica esféricas completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. La bicapa lipídica incluye dos monocapas lipídicas compuestas por lípidos que tienen una región de cola hidrofóbica y una región de cabeza hidrofílica. La estructura de la bicapa de la membrana es tal que las colas no polares hidrofóbicas de las moléculas lipídicas se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las cabezas hidrofílicas se orientan hacia las fases acuosas tanto en el exterior como en el interior del liposoma. La región nuclear hidrofílica acuosa de un liposoma puede incluir una sustancia bioactiva disuelta.

35

40

La administración de sustancias hidrofóbicas farmacéuticamente útiles es con frecuencia particularmente problemática debido a que son insolubles o poco solubles en un ambiente acuoso. Para compuestos hidrofóbicos utilizados como productos farmacéuticos, la inyección directa puede resultar imposible o altamente problemática, dando lugar a condiciones peligrosas tales como hemólisis, flebitis, hipersensibilidad, fallo orgánico y/o muerte. Se necesitan formulaciones mejoradas para sustancias bioactivas hidrofóbicas que promuevan la estabilidad en un ambiente acuoso y permitan una administración eficiente de tales sustancias a un sitio de acción deseado.

45

US-B-6.514.523 describe partículas de soporte para administración de fármacos que contienen una composición lipídica, donde el componente fosfolipídico existe como una monocapa.

50

Burke et al., *Biochemistry* 1993, 32, 5352-5364, describen el reparto en bicapa lipídica y la estabilidad de la camptotecina. Se dice que las interacciones de la bicapa lipídica estabilizan la estructura del anillo de lactona de las camptotecinas.

55

Versluis et al., *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289: 1-7, 1999, describen liposomas que tienen apolipoproteína expuesta sobre su superficie. Lundberg, *Anti-Cancer Drug Design*, 1998, 13: 453-461, describe ésteres de ácido oleico de camptotecina y sus análogos que pueden intercalarse en bicapas liposómicas y emulsiones lipídicas submicrónicas.

60

Lister, *Eur. J. Haematol.*, 1996, 56 (supl.): 18-23, describe un complejo de anfotericina B y lípidos que comprende anfotericina B acomplejada con dos lípidos.

Breve descripción de la invención

La invención proporciona composiciones y su uso en métodos para administración de un agente bioactivo a un individuo.

5 En un aspecto, la invención proporciona una partícula de administración de un agente bioactivo que consiste en un polipéptido de unión a lípidos, una bicapa lipídica y un agente bioactivo que tiene al menos una región hidrofóbica, donde el agente bioactivo no es un polipéptido, y que no tiene un núcleo acuoso, donde el interior de la bicapa lipídica tiene una región hidrofóbica, y el agente bioactivo se incorpora a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, y el agente bioactivo se incorpora a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, y donde la partícula tiene forma de disco con una bicapa lipídica discoidal circunscrita por α -hélices anfipáticas y/o láminas β del polipéptido de unión a lípidos, que se asocian con las superficies hidrofóbicas de la bicapa alrededor de la periferia de la partícula, y donde dicho polipéptido de unión a lípidos tiene una estructura de α -hélice anfipática de clase A y/o una unidad de lámina β .

15 Las partículas de administración de agentes bioactivos incluyen uno o más agentes bioactivos que tienen al menos una región hidrofóbica y se incorporan o asocian al interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. La(s) región(es) hidrofóbica(s) de un agente bioactivo se asocian generalmente a superficies hidrofóbicas en el interior de la bicapa lipídica, v.g., cadenas grasas de acilos. En una realización, el agente bioactivo es anfotericina B (AmB). En otra realización, el agente bioactivo es camptotecina.

20 Las partículas tienen típicamente forma de disco, con un diámetro en el rango de aproximadamente 7 a aproximadamente 29 nm.

25 Las partículas de administración de agentes bioactivos incluyen lípidos formadores de bicapa, por ejemplo fosfolípidos. En algunas realizaciones, una partícula de administración de agentes bioactivos incluye lípidos tanto formadores de bicapa como no formadores de bicapa. En algunas realizaciones, la bicapa lipídica de una partícula de administración de agentes bioactivos incluye fosfolípidos. En una realización, los fosfolípidos incorporados a una partícula de administración incluyen dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). En una realización, la bicapa lipídica incluye DMPC y DMPG en una proporción molar de 7:3.

30 En una realización preferida, el polipéptido de unión a lípidos es una apolipoproteína. La interacción predominante entre polipéptidos de unión a lípidos, v.g., moléculas de apolipoproteína, y la bicapa lipídica es generalmente una interacción hidrofóbica entre residuos sobre una cara hidrofóbica de una estructura anfipática, v.g., una α -hélice del polipéptido de unión a lípidos, y cadenas grasas acílicas de lípidos sobre una superficie exterior en el perímetro de la partícula. Las partículas de la invención pueden incluir apolipoproteínas intercambiables y/o no intercambiables. En una realización, el polipéptido de unión a lípidos es la Apolipoproteína A-I (ApoA-I).

35 En algunas realizaciones, se proporcionan partículas que incluyen moléculas de polipéptidos de unión a lípidos, v.g., moléculas de apolipoproteína, que han sido modificadas para aumentar la estabilidad de la partícula. En una realización, la modificación incluye la introducción de residuos de cisteína para formar enlaces disulfuro intramoleculares y/o intermoleculares.

40 En otra realización, se proporcionan partículas que incluyen una molécula quimérica de polipéptido de unión a lípidos, v.g., una molécula quimérica de apolipoproteína, con uno o más restos funcionales unidos, por ejemplo uno o más restos de focalización hacia el objetivo y/o uno o más restos que tienen una actividad biológica deseada, v.g., actividad antimicrobiana, que pueden aumentar o trabajar sinérgicamente con la actividad de un agente bioactivo incorporado a la partícula de administración.

45 En otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que incluye una partícula de administración de agentes bioactivos en un soporte farmacéuticamente aceptable. También se discute un método de administración de un agente bioactivo a un individuo, que incluye la administración de una composición farmacéutica que contiene partículas de administración del agente bioactivo en un soporte farmacéuticamente aceptable al individuo. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del agente bioactivo en un soporte farmacéuticamente aceptable. La administración puede ser parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular, transmucosal o intratecal. Se pueden administrar las partículas como aerosol. En algunas realizaciones, se formula el agente bioactivo para liberación controlada. En una realización, se discute un método de tratamiento de una infección fúngica en un individuo, incluyendo la administración de un agente antifúngico, por ejemplo AmB, incorporado en partículas de administración de agentes bioactivos de la invención, frecuentemente en una cantidad terapéuticamente efectiva en un soporte farmacéuticamente aceptable. También se discute un método de tratamiento de un tumor en un individuo, incluyendo la administración de un agente antitumoral, por ejemplo camptotecina, incorporado en partículas de administración de agentes bioactivos de la invención, frecuentemente en una cantidad terapéuticamente efectiva en un soporte farmacéuticamente aceptable. En una realización, las partículas de administración del agente bioactivo incluyen un polipéptido de unión a lípidos con un resto unido de focalización hacia péptidos intestinales vasoactivos,

y el tumor es un tumor mamario.

En aún otro aspecto, se proporcionan procedimientos para formular partículas de administración de agentes bioactivos como se ha descrito anteriormente. En una realización, el procedimiento de formulación comprende el contacto de una mezcla que incluye lípidos formadores de bicapa y un agente bioactivo para formar una mezcla de vesículas lipídicas-agente bioactivo, y el contacto de la mezcla de vesículas lipídicas-agente bioactivo con un polipéptido de unión a lípidos. En otra realización, el procedimiento de formulación comprende la formación de una dispersión de vesículas lipídicas que contienen una bicapa preformada a las que se añade un agente bioactivo, disuelto en un solvente apropiado. Como solventes apropiados para solubilizar un agente bioactivo para este procedimiento, se incluyen solventes con carácter polar o hidrofílico capaces de solubilizar un agente bioactivo que se ha de incorporar a una partícula de administración de la invención. Como ejemplos de solventes adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, sulfóxido de dimetilo (DMSO) y dimetilformamida. Se añaden a la mezcla de vesículas/agente bioactivo polipéptidos de unión a lípidos, seguido de incubación, sonicación o ambas. En una realización, el agente bioactivo incorporado a una partícula de administración por cualquiera de los procedimientos anteriores es la Anfotericina B. En una realización, se solubiliza la anfotericina B en DMSO. En otra realización, el agente bioactivo es la camptotecina. En una realización, se solubiliza la camptotecina en DMSO.

La invención incluye partículas de administración de agentes bioactivos preparadas según cualquiera de los procedimientos antes descritos y composiciones farmacéuticas que incluyen partículas preparadas según cualquiera de los procedimientos anteriores y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención proporciona kits que incluyen cualquiera de las partículas de administración de agentes bioactivos o composiciones farmacéuticas antes descritas, o partículas de administración preparadas por cualquiera de los métodos anteriores, y/o reactivos para formular las partículas y/o instrucciones para uso en un método para administrar un agente bioactivo a un individuo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un espectro de absorbancia UV/Visible, de 250 a 450 nm, de partículas de ApoA-I-fosfolípido sin un agente bioactivo, preparadas como en el Ejemplo 1.

La Figura 2 representa un espectro de absorbancia UV/Visible, de 250 a 450 nm, de partículas de ApoA-I-fosfolípido-AmB, preparadas como en el Ejemplo 1.

La Figura 3 representa un gráfico del número de fracción frente a la concentración proteica para partículas de ApoA-I-fosfolípido-AmB tras ultracentrifugación en gradiente de densidad. Se prepararon partículas como se describe en el Ejemplo 2 y se ajustaron a 1,3 g/ml de densidad por adición de KBr. Se centrifugó la solución en un gradiente discontinuo durante 5 horas a 275.000 x g a 10°C. Después de la centrifugación, se fraccionaron los contenidos del tubo desde la parte de arriba y se determinó el contenido proteico en cada fracción.

La Figura 4 representa un análisis de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) nativa de partículas de ApoA-I-fosfolípido sobre un gel plano en gradiente de acrilamida del 4-20%. Se prepararon las partículas con ApoA-I y dos preparaciones lipídicas diferentes, DMPC/DMPG o palmitoiloleilfosfatidilcolina (POPC). Se tiñó el gel con Azul Coomassie. Calle 1: partículas de ApoA-I POPC; Calle 2: partículas de ApoA-I-POPC-AmB; Calle 3: partículas de ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB. A la izquierda se muestra la migración relativa de los patrones de tamaño.

La Figura 5 representa una comparación de los efectos de diferentes condiciones de almacenamiento sobre el tamaño y la integridad estructural del dominio EN-terminal de la Apolipoproteína (ApoE3NT)-DMPC/DMPG-AmB. Se aislaron las partículas por ultracentrifugación por densidad y se sometieron luego a electroforesis en un gel plano en gradiente del 4-20% de PAGE nativa. Se tiñó el gel con Amido Black. Calle 1: partículas almacenadas en tampón fosfato a 4°C durante 24 horas; Calle 2: partículas almacenadas en tampón fosfato a -20°C durante 24 horas; Calle 3: partículas liofilizadas y congeladas a -80°C durante 24 horas y luego redisueltas en H₂O. A la izquierda se muestra la migración relativa de los patrones de tamaño.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente la forma y la organización molecular de una partícula de administración de agente bioactivo.

La Figura 7 ilustra esquemáticamente polipéptidos quiméricos de unión a lípidos y su incorporación en una partícula de administración de agente bioactivo. Las proteínas quiméricas pueden incluir un resto de focalización hacia el objetivo (Figura 7A) o un resto con una actividad biológica deseada (Figura 7B). La Figura 7C ilustra esquemáticamente la incorporación de los polipéptidos quiméricos mostrados en las Figuras 7A y 7B en una partícula de administración de agente bioactivo.

La Figura 8 representa gráficamente la actividad antifúngica de partículas de administración de agente bioactivo que contienen AmB frente a *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) en cultivo, como se describe en el Ejemplo 2.

5 La Figura 9 es una micrografía electrónica de fractura por congelación de partículas de administración de agente bioactivo que contienen AmB, preparadas como se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 10 muestra una comparación entre la capacidad de partículas de ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB y AmBisome[®] para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae*, como se describe en el Ejemplo 8.

10 La Figura 11 muestra la comparación del espectro de fluorescencia entre camptotecina solubilizada en SDS (Figura 11A) y partículas de administración de agente bioactivo que contienen camptotecina (Figura 11B), como se describe en el Ejemplo 9.

15 La Figura 12 representa una comparación del espectro UV/visible de la incorporación de AmB en partículas lipídicas preparadas como se describe en el Ejemplo 7 (Figura 12A) y partículas de administración de agente bioactivo preparadas como se describe en el Ejemplo 6 (Figura 12B).

20 La Figura 13 es una ilustración de una realización de un procedimiento de preparación de partículas de administración de agentes bioactivos.

Descripción detallada de la invención

25 La invención proporciona composiciones y métodos para la administración de un agente bioactivo a un individuo. Se proporcionan los vehículos de administración en forma de un agente bioactivo incorporado a una partícula que incluye un polipéptido de unión a lípidos y una bicapa lipídica. El interior de la partícula incluye una región hidrofóbica de la bicapa lipídica que tiene porciones hidrofóbicas de moléculas lipídicas, v.g., cadenas acílicas grasas de lípidos, en contraste con los liposomas, que incluyen un interior acuoso totalmente encerrado rodeado de superficies hidrofílicas lipídicas de una bicapa. La naturaleza hidrofóbica del interior de una partícula de la invención permite la incorporación de moléculas hidrofóbicas, por ejemplo por intercalación entre moléculas lipídicas en la bicapa o secuestro en la región hidrofóbica entre las láminas de la bicapa. Se puede incorporar un agente bioactivo que incluya al menos una región hidrofóbica al interior hidrofóbico de la partícula. Tal como se usa aquí, "incorporación" de un agente bioactivo a la región hidrofóbica de una bicapa lipídica se refiere a la solubilización en, o a la asociación con, una región hidrofóbica o porciones hidrofóbicas de moléculas lipídicas de la bicapa, v.g., cadenas acílicas grasas de lípidos que forman la bicapa, o a la intercalación con las cadenas acílicas grasas.

35 Las partículas tienen generalmente forma de disco, con un diámetro en el rango de aproximadamente 7 a 29 nm, determinado por electroforesis en gel en gradiente limitante de poro nativo, en comparación con patrones de diámetro de Stokes conocido, como se describe, por ejemplo, en Blanche et al. (1981), *Biochim. Biophys. Acta* 665(3): 408-19. En algunas realizaciones, las partículas son estables en solución y pueden ser liofilizadas para almacenamiento a largo plazo, seguido de reconstitución en solución acuosa. El componente polipeptídico de unión a lípidos define los límites de la bicapa discoidal y proporciona estructura y estabilidad a las partículas.

40 También se proporcionan moléculas químicas de polipéptidos de unión a lípidos (v.g., moléculas de apolipoproteína) y se pueden utilizar para incorporar diversas propiedades funcionales adicionales a las partículas de administración de la invención.

Se pueden administrar las partículas a un individuo para suministrar un agente bioactivo al individuo.

Partículas de administración de agentes bioactivos

50 La invención proporciona una "partícula" (también denominada aquí "partícula de administración" o "partícula de administración de agentes bioactivos") que incluye uno o más tipos de polipéptido de unión a lípidos, una bicapa lipídica que comprende uno o más tipos de lípido formador de bicapa y uno o más agentes bioactivos, y no tiene núcleo acuoso. En algunas realizaciones, una partícula de administración incluye también uno o más tipos de lípido no formador de bicapa. También se proporcionan composiciones que incluyen las partículas. En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye partículas de administración y un soporte farmacéuticamente aceptable.

60 El interior de una partícula incluye una región hidrofóbica (v.g., compuesta por cadenas acílicas grasas de lípidos). Las partículas de la invención típicamente no contienen un núcleo hidrofílico. Las partículas tienen generalmente forma de disco, con una bicapa lipídica más o menos circular, discoidal y plana circunscrita por α -hélices y/o láminas β anfipáticas de los polipéptidos de unión a lípidos, que se asocian con superficies hidrofóbicas de la bicapa alrededor de la periferia del disco. Se representa esquemáticamente un ejemplo ilustrativo de una partícula de

administración de agentes bioactivos en forma de disco de la invención en la Fig. 6.

Típicamente, el diámetro de una partícula de administración en forma de disco es de aproximadamente 7 a aproximadamente 29 nm, frecuentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nm, frecuentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 nm. "Diámetro" se refiere al diámetro de una de las caras de forma más o menos circular del disco.

Polipéptidos de unión a lípidos

Tal como se usa aquí, un "polipéptido de unión a lípidos" se refiere a cualquier péptido o proteína sintética o natural que forme una interacción estable con superficies lipídicas y pueda funcionar para estabilizar la bicapa lipídica de una partícula de la invención. Las partículas pueden incluir uno o más tipos de polipéptidos de unión a lípidos, es decir, que los polipéptidos de unión a lípidos en una sola partícula pueden ser idénticos o pueden estar compuestos por dos o más secuencias polipeptídicas diferentes. Los polipéptidos de unión a lípidos circunscriben la periferia de la partícula.

En algunas realizaciones, como polipéptidos de unión a lípidos útiles para la producción de partículas de administración según la invención, se incluyen proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de una proteína natural, o un fragmento, variante natural, isoforma, análogo o forma quimérica de la misma, proteínas que tienen una secuencia no natural y proteínas o péptidos de cualquier longitud que poseen propiedades de unión a lípidos consistentes con las apolipoproteínas conocidas, y que puedan ser purificadas a partir de fuentes naturales, producidas recombinantemente o producidas sintéticamente. Se puede usar un análogo de una proteína natural. Un polipéptido de unión a lípidos puede incluir uno o más aminoácidos no naturales (v.g., D-aminoácidos), análogos de aminoácidos o una estructura peptidomimética, en donde el enlace peptídico está sustituido por una estructura más resistente a la degradación metabólica, o se substituyen aminoácidos individuales por estructuras análogas.

En una realización preferida, el polipéptido de unión a lípidos es una apolipoproteína. Se puede usar cualquier apolipoproteína o fragmento o análogo de la misma que sea capaz de asociarse a una bicapa lipídica para formar una partícula en forma de disco. Las partículas pueden incluir moléculas de apolipoproteínas intercambiables, no intercambiables o una mezcla de intercambiables y no intercambiables.

Las apolipoproteínas poseen generalmente una unidad estructural de α -hélice anfipática de clase A (Segrest et al. (1994), Adv. Protein Chem. 45: 303-369) y/o una unidad de lámina β . Las apolipoproteínas incluyen generalmente un alto contenido en estructura secundaria de α -hélice con capacidad para unirse a superficies hidrofóbicas. Un rasgo característico de estas proteínas es su capacidad para interactuar con ciertas vesículas de bicapa lipídica y transformarlas en complejos con forma de disco (para una revisión, véase Narayanaswami y Ryan (2000), Biochimica et Biophysica Acta 1483: 15-36). Al contacto con lípidos, la proteína sufre un cambio conformacional, adaptando su estructura para acomodarse a la interacción con lípidos.

En general, la interacción predominante entre las apolipoproteínas y la bicapa lipídica en una partícula se realiza a través de una interacción hidrofóbica entre los residuos sobre las caras hidrofóbicas de las α -hélices anfipáticas de las moléculas de apolipoproteínas y las superficies hidrofóbicas de los lípidos, por ejemplo cadenas acílicas grasas de fosfolípidos, en el borde de la bicapa en la periferia de la partícula de administración de agentes bioactivos. Una α -hélice anfipática de una molécula de apolipoproteína incluye tanto una superficie hidrofóbica en contacto con una superficie hidrofóbica de la bicapa lipídica en la periferia de la partícula como una superficie hidrofílica que mira al exterior de la partícula y está en contacto con el ambiente acuoso cuando la partícula está suspendida en medio acuoso. En algunas realizaciones, una apolipoproteína puede incluir una estructura de lámina β anfipática donde los residuos hidrofóbicos de la lámina β interactúan con las superficies hidrofóbicas lipídicas en la periferia del disco.

Una partícula de administración de agentes bioactivos tiene con frecuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de uno o más tipos de apolipoproteína por partícula. La cantidad de α -hélice anfipática aportada por las apolipoproteínas en una partícula es generalmente suficiente para cubrir la superficie hidrofóbica de otro modo expuesta de las moléculas de lípidos localizadas en el borde de la bicapa lipídica en forma de disco (es decir, la periferia de la partícula). En una realización en la que la apolipoproteína es apolipoproteína A-I (ApoA-I) humana y la bicapa lipídica incluye palmitoilooleoilfosfatidilcolina, una partícula contiene 2 moléculas de ApoA-I en una proporción de aproximadamente 80 moléculas de fosfolípido a aproximadamente 1 molécula de ApoA-I.

Como ejemplos de apolipoproteínas que pueden ser utilizadas para la formación de las partículas de administración de la invención, se incluyen, aunque sin limitación, ApoA-I, apolipoproteína E (ApoE) y apolipoproteína III (ApoIII), apolipoproteína A-IV (ApoA-IV), apolipoproteína A-V (ApoA-V), apolipoproteína C-I (ApoC-I), apolipoproteína C-II (ApoC-II), apolipoproteína C-III (ApoC-III), apolipoproteína D (ApoD), apolipoproteína A-II (ApoA-II), apolipoproteína B-100 (ApoB-100), apolipoproteína J (ApoJ), apolipoproteína H (ApoH) o fragmentos, variantes naturales, isoformas,

análogos o formas quiméricas de las mismas. En algunas realizaciones, la apolipoproteína es la ApoA-I humana. En otras realizaciones, la apolipoproteína es el dominio C-terminal o N-terminal de la apolipoproteína E3, o sus isoformas. En algunas realizaciones, la apolipoproteína incluye un resto funcional que se ha unido sintéticamente o recombinantemente, tal como un resto de focalización hacia el objetivo o un resto que tiene actividad biológica, que no es intrínseca a la apolipoproteína (véase, v.g., la Fig. 7).

En algunas realizaciones, se usa una apolipoproteína intercambiable. Una "apolipoproteína intercambiable" puede ser desplazada de una partícula discoidal preformada de la invención por otra proteína o péptido con afinidad de unión por los lípidos, sin destruir la integridad de la partícula. Como apolipoproteínas intercambiables, se incluyen péptidos o proteínas sintéticos o naturales capaces de formar una interacción de unión estable con los lípidos. Se han identificado más de una docena de apolipoproteínas intercambiables únicas tanto en vertebrados como en invertebrados (véase, v.g., Narayanaswami y Ryan, antes citado).

En algunas realizaciones, se usa una apolipoproteína no intercambiable. Tal como se utiliza aquí, "apolipoproteína no intercambiable" se refiere a una proteína o péptido que forma una interacción estable con las superficies lipídicas y puede funcionar estabilizando la bicapa fosfolipídica de las partículas de la invención, pero que no se puede eliminar de la superficie de la partícula sin destruir la estructura intrínseca de la partícula.

Agentes bioactivos

Las partículas de administración incluyen uno o más agentes bioactivos. Tal como se usa aquí, "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto o composición que tenga actividad biológica, incluyendo terapéutica o diagnóstica. Un agente bioactivo puede ser un agente farmacéutico, un fármaco, un compuesto o una composición que sea útil en el tratamiento, el diagnóstico o la profilaxis médica.

Los agentes bioactivos incorporados en partículas de administración como se describe aquí incluyen generalmente al menos una región hidrofóbica (v.g., lipofílica) capaz de asociarse con o integrarse en la porción hidrofóbica de una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, al menos una porción del agente bioactivo está intercalada entre las moléculas lipídicas en el interior de la partícula de administración. Como ejemplos de agentes bioactivos que pueden incorporarse a partículas de administración según la invención, se incluyen, aunque sin limitación, agentes antibióticos o antimicrobianos (v.g., antibacterianos, antifúngicos y antivíricos), agentes antimetabólicos, agentes antineoplásicos, esteroides, péptidos, proteínas tales como, por ejemplo, proteínas de receptores celulares, enzimas, hormonas y neurotransmisores, radiomarcadores tales como radioisótopos y compuestos marcados con radioisótopos, compuestos fluorescentes, anestésicos, lípidos bioactivos, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, nutrientes, antígenos, pesticidas, insecticidas, herbicidas o un agente fotosensibilizante utilizado en terapia fotodinámica. En una realización, el agente bioactivo es el agente antifúngico AmB. En otras realizaciones, el agente bioactivo es la camptotecina, el ácido retinoico todo trans, la annamicina, la nistatina, el paclitaxel, el docetaxel o las etiopurpurinas. Los agentes bioactivos que incluyen al menos una región hidrofóbica son conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, ibuprofeno, diazepam, griseofulvina, ciclosporina, cortisona, proleucina, etopósido, taxano, α -tocoferol, Vitamina E, Vitamina A y lipopolisacáridos. Véanse, por ejemplo, Kagkadis et al. (1996), PDA J. Pharm. Sci. Tech. 50(5): 317-323; Dardel (1976), Anaesth. Scand. 20: 221-24; Sweetana y Akers (1996), PDA J. Pharm. Sci. Tech. 50(5): 330-342; Pat. EE.UU. N° 6.458.373.

En algunas realizaciones, un agente bioactivo incorporado a una partícula de administración de la invención es distinto de un polipéptido. En algunas realizaciones, para administración a un individuo, un agente bioactivo y la partícula de administración que incluye el agente bioactivo son substancialmente no inmunogénicos cuando se administran a un individuo.

Bicapa lipídica

Las partículas de la invención incluyen una bicapa lipídica, teniendo las caras generalmente circulares del disco grupos de cabeza polares que se orientan alejándose del interior de la partícula, y teniendo el interior de la partícula (es decir, el espacio entre las caras circulares) una región hidrofóbica de la bicapa lipídica que contiene porciones hidrofóbicas de lípido(s) formador(es) de bicapa y otros componentes lipídicos, de estar presentes. Las superficies hidrofóbicas de las moléculas de lípidos en el borde de la bicapa (la superficie en la periferia de la partícula de administración de agentes bioactivos) contactan con los polipéptidos de unión a lípidos de las partículas, como se ha discutido anteriormente. Las partículas pueden incluir uno o más tipos de lípidos formadores de bicapa, o una mezcla de uno o más tipos de lípidos formadores de bicapa y uno o más tipos de lípidos no formadores de bicapa. Tal como se usa aquí, "lípido" se refiere a una sustancia de origen biológico o sintético que es soluble o parcialmente soluble en solventes orgánicos o que se reparte en un ambiente hidrofóbico cuando está presente en fase acuosa.

Se puede usar cualquier lípido formador de bicapa que sea capaz de asociarse con un polipéptido de unión a lípidos

para formar una estructura en forma de disco según la invención. Tal como se usa aquí, "lípidos formadores de bicapa" se refiere a un lípido que es capaz de formar una bicapa lipídica con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico. Como lípidos formadores de bicapa, se incluyen, aunque sin limitación, fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, alquilfosfolípidos, lípidos etéricos y plasmalógenos. Se puede usar un tipo de lípido formador de bicapa o una mezcla de dos o más tipos. En algunas realizaciones, la bicapa lipídica incluye fosfolípidos. Como ejemplos de fosfolípidos adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, DMPC, DMPG, POPC, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), cardiolipina, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), distearoilfosfatidilglicerol (DSPG), fosfatidilcolina de yema de huevo (PC de huevo), fosfatidilcolina de soja, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y fosfolípidos catiónicos. Como ejemplos de otros lípidos formadores de bicapa adecuados, se incluyen lípidos y glicolípidos catiónicos. En una realización, las partículas incluyen una bicapa fosfolipídica de DMPC y DMPG, frecuentemente en una proporción molar de aproximadamente 7:3. En otra realización, las partículas incluyen una bicapa fosfolipídica de POPC. En algunas realizaciones, se pueden usar mezclas de lípidos formadores de bicapa en proporciones molares de cualquiera de al menos aproximadamente 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 3:7, 1:2 ó 1:1.

Las partículas pueden también incluir lípidos que no sean lípidos formadores de bicapa. Dichos lípidos incluyen, aunque sin limitación, colesterol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina (este lípido puede formar bicapas en determinadas circunstancias), oxisteroles, esteroides vegetales, ergosterol, sitosterol, lípidos catiónicos, cerebrósidos, esfingosina, ceramida, diacilglicerol, monoacilglicerol, triacilglicerol, gangliósidos, lípidos etéricos, alquilfosfolípidos, plasmalógenos, prostaglandinas y lisofosfolípidos. En algunas realizaciones, un lípido utilizado para la preparación de una partícula de administración puede incluir uno o más restos funcionales unidos, tales como restos de focalización hacia el objetivo, agentes bioactivos o marcajes para purificación o detección.

Polipéptidos quiméricos de unión a lípidos

La invención proporciona polipéptidos quiméricos de unión a lípidos, que pueden ser utilizados para preparar las partículas de administración antes descritas. Un polipéptido quimérico de unión a lípidos puede incluir uno o más "restos funcionales" unidos, tales como, por ejemplo, uno o más restos de focalización hacia el objetivo, un resto que tiene una actividad biológica deseada, un marcaje de afinidad para ayudar con la purificación y/o una molécula indicadora para estudios de caracterización o localización. Un resto unido con actividad biológica puede tener una actividad que sea capaz de aumentar y/o sinergizar con la actividad biológica de un agente bioactivo incorporado a la partícula de administración. Por ejemplo, un resto con actividad biológica puede tener actividad antimicrobiana (por ejemplo, antifúngica, antibacteriana, antiprotzoaria, bacteriostática, fungistática o antivírica). En una realización, un resto funcional unido de un polipéptido quimérico de unión a lípidos no está en contacto con las superficies hidrofóbicas de la bicapa lipídica cuando se incorpora el polipéptido de unión a lípidos a una partícula de administración de agentes bioactivos. En otra realización, un resto funcional unido está en contacto con las superficies hidrofóbicas de la bicapa lipídica cuando se incorpora el polipéptido de unión a lípidos a una partícula de administración de agentes bioactivos. En algunas realizaciones, un resto funcional de un polipéptido quimérico de unión a lípidos puede ser intrínseco a una proteína natural. En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico de unión a lípidos incluye un ligando o secuencia reconocida por, o capaz de interactuar con, un receptor de la superficie celular u otro resto de la superficie celular.

En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico de unión a lípidos es una apolipoproteína quimérica. En una realización, una apolipoproteína quimérica incluye un resto de focalización hacia el objetivo que no es intrínseco a la apolipoproteína nativa, tal como, por ejemplo, el péptido del factor de apareamiento α de *S. cerevisiae*, el ácido fólico, la transferrina o la lactoferrina. En otra realización, una apolipoproteína quimérica incluye un resto con una actividad biológica deseada que aumenta y/o sinergiza con la actividad de un agente bioactivo incorporado a la partícula de administración, tal como, por ejemplo, la histatina-5, el péptido de magainina, la melitina, la defensina, la colicina, el péptido de lactoferrina N-terminal, la equinocandina, la hepcidina, la bactericina o la ciclosporina. En una realización, un polipéptido quimérico de unión a lípidos puede incluir un resto funcional intrínseco a una apolipoproteína. Un ejemplo de un resto funcional intrínseco a apolipoproteína es el resto intrínseco de focalización hacia el objetivo formado aproximadamente por los aminoácidos 130-150 de la ApoE humana, que comprende la región de unión a receptores reconocida por los miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Otros ejemplos de restos funcionales intrínsecos a apolipoproteínas incluyen la región de ApoB-100, que interactúa con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, y la región de ApoA-I, que interactúa con el receptor depurador de tipo B1. En otras realizaciones, se puede añadir un resto funcional sintético o recombinantemente para producir un polipéptido quimérico de unión a lípidos.

Tal como se usa aquí, "quimérico" se refiere a dos o más moléculas que son capaces de existir por separado y se unen entre sí para formar una única molécula que tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes. Las moléculas constituyentes de una molécula quimérica pueden ser unidas sintéticamente por conjugación química o, cuando las moléculas constituyentes son todas polipéptidos o análogos de los mismos, se pueden fusionar los polinucleótidos codificantes de los polipéptidos entre sí recombinantemente de tal manera que

se exprese un solo polipéptido continuo. Dicha molécula quimérica se denomina proteína de fusión. Una "proteína de fusión" es una molécula quimérica en la que las moléculas constituyentes son todas polipéptidos y se unen (fusionan) entre sí de tal modo que la molécula quimérica forma una sola cadena continua. Los diversos constituyentes pueden unirse directamente entre sí o pueden copularse a través de uno o más conectores.

Un "conector" o "espaciador", tal como se utiliza aquí en relación a una molécula quimérica, se refiere a cualquier molécula que conecte o una las moléculas constituyentes de la molécula quimérica. Se dispone comercialmente de una serie de moléculas conectoras, por ejemplo de Pierce Chemical Company, Rockford Illinois. Los conectores adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, conectores carbonados de cadena lineal o ramificada, conectores carbonados heterocíclicos o conectores peptídicos. Cuando la molécula quimérica es una proteína de fusión, el conector puede ser un péptido que una las proteínas que constituyen una proteína de fusión. Aunque un espaciador generalmente no tiene una actividad biológica específica aparte de unir las proteínas o de conservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas, los aminoácidos constituyentes de un espaciador peptídico pueden ser seleccionados de manera que influyan en alguna propiedad de la molécula, tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad.

En algunas realizaciones, se prepara un polipéptido quimérico de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína quimérica, por conjugación química de la molécula del polipéptido de unión a lípidos y el resto funcional que se ha de unir. Los medios de conjugación química de moléculas son bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos medios variarán según la estructura del resto que se ha de unir, pero serán fácilmente determinables para los expertos en la técnica.

Los polipéptidos típicamente contienen una variedad de grupos funcionales, v.g., grupos ácido carboxílico (-COOH), amino libre (-NH₂) o sulfhidrilo (-SH), disponibles para reacción con un grupo funcional adecuado en el resto funcional o en un conector para unir el resto al mismo. Un resto funcional puede unirse en el extremo N o el extremo C o a un grupo funcional en un residuo interior (es decir, un residuo en una posición intermedia entre los extremos N y C) de una molécula de apolipoproteína. Alternativamente, se pueden derivatizar la apolipoproteína y/o el resto que se han de marcar para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales.

En algunas realizaciones, se sintetizan proteínas de fusión de polipéptidos de unión a lípidos que incluyen un resto funcional polipeptídico utilizando sistemas de expresión recombinantes. Típicamente, esto implica crear una secuencia de ácido nucleico (v.g., ADN) que codifique el polipéptido de unión a lípidos y el resto funcional, de tal forma que los dos polipéptidos estén en marco cuando se expresen, poner el ADN bajo el control de un promotor, expresar la proteína en una célula huésped y aislar la proteína expresada.

Las secuencias de polipéptidos de unión a lípidos y las secuencias codificantes de restos funcionales como aquí se describen pueden ser clonadas o amplificadas por métodos *in vitro*, tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS) o el sistema de replicación de secuencias autosostenido (SSR). Una amplia variedad de metodologías de clonación y de amplificación *in vitro* son bien conocidas para los expertos. Se encuentran ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de los métodos de amplificación *in vitro*, por ejemplo, en Mullis et al. (1987), Patente EE.UU. Nº 4.683.202; PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds.), Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de Octubre de 1990), C&EN 36-47; The Journal of NIH Research (1991) 3: 81-94; Kwoh et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989), J. Clin. Chem., 35: 1826; Landegren et al. (1988), Science, 241: 1077-1080; Van Brunt (1990), Biotechnology, 8: 291-294; Wu y Wallace (1989), Gene, 4: 560; y Barringer et al. (1990), Gene, 89: 117.

Además, se puede preparar ADN codificante de secuencias de proteínas de fusión deseadas sintéticamente utilizando métodos que son bien conocidos para los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la síntesis química directa por métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang et al. (1979), Meth. Enzymol. 68: 90-99, el método del fosfodiéster de Brown et al. (1979), Meth. Enzymol. 68: 109-151, el método de la dietilfosforamida de Beaucage et al. (1981), Tetra. Lett., 22: 1859-1862, o el método del soporte sólido de la Patente EE.UU. Nº 4.458.066.

Se puede incorporar un ácido nucleico codificante de un polipéptido de fusión quimérico de polipéptidos de unión a lípidos a un vector de expresión recombinante en una forma adecuada para expresión en una célula huésped. Tal como se usa aquí, un "vector de expresión" es un ácido nucleico que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. El vector puede también incluir secuencias reguladoras, tales como promotores, potenciadores u otros elementos de control de expresión (v.g., señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras son conocidas para los expertos en la técnica (véanse, v.g., Goeddel (1990), Gene Expression Technology: Meth. Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, CA; Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA;

Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, etc.).

En algunas realizaciones, un vector de expresión recombinante para la producción de un polipéptido quimérico de unión a lípidos es un plásmido o un cósmido. En otras realizaciones, el vector de expresión es un virus, o porción del mismo, que permite la expresión de una proteína codificada por el ácido nucleico introducido en el ácido nucleico vírico. Por ejemplo, se pueden usar retrovirus defectuosos en cuanto a replicación, adenovirus y virus adeno-asociados. Los vectores de expresión pueden derivar de vectores bacteriófagos, incluyendo todos los fagos de ADN y ARN (v.g., cósmidos), o víricos derivados de todos los virus eucarióticos, tales como baculovirus y retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados, virus Herpes, virus Vaccinia y todos los virus de ADN de una sola cadena, de doble cadena y parcialmente de doble cadena, todos los virus de ARN de cadena positiva y negativa y los retrovirus defectuosos en cuanto a replicación. Otro ejemplo de un vector de expresión es un cromosoma artificial de levadura (YAC), que contiene tanto un centrómero como dos telómeros, permitiendo a los YAC replicarse como pequeños cromosomas lineales. Otro ejemplo es un cromosoma artificial bacteriano (BAC).

Las proteínas de fusión quiméricas de polipéptidos de unión a lípidos de esta invención pueden expresarse en una célula huésped. Tal como se usa aquí, el término "célula huésped" se refiere a cualquier célula o línea celular en la que se pueda transfectar para expresión un vector de expresión recombinante para la producción de una proteína de fusión de apolipoproteína quimérica, como se ha descrito anteriormente. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no necesariamente ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico total) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas o transformadas *in vivo* con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Como células huésped adecuadas, se incluyen, aunque sin limitación, células bacterianas (v.g., *E. coli*), células fúngicas (v.g., *S. cerevisiae*), células de invertebrados (v.g., células de insectos, tales como células SF9) y células de vertebrados, incluyendo células de mamíferos.

Un vector de expresión codificante de una proteína de fusión quimérica de polipéptido de unión a lípidos puede ser transfectado en una célula huésped usando técnicas estándar. "Transfección" o "transformación" se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula huésped. Se puede mantener el polinucleótido exógeno como un vector no integrado, tal como, por ejemplo, un plásmido, o alternativamente se puede integrar en el genoma de la célula huésped. Como ejemplos de técnicas de transfección, se incluyen, aunque sin limitación, la coprecipitación con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección, la electroporación y la microinyección. Se pueden encontrar métodos adecuados para transfectar células huésped en Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y otros libros de texto de laboratorio. También se puede transferir ácido nucleico a células por un mecanismo de administración adecuado para la introducción de ácido nucleico en células *in vivo*, tal como mediante un vector retrovírico (véanse, v.g., Ferry et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 8377-8381, y Kay et al. (1992), *Human Gene Therapy* 3: 641-647), un vector adenovírico (véanse, v.g., Rosenfeld (1992), *Cell* 68: 143-155, y Herz y Gerard (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 2812-2816), captación de ADN mediada por receptores (véanse, v.g., Wu y Wu (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 14621; Wilson et al. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 963-967, y Pat. EE.UU. N° 5.166.320), inyección directa de ADN (véanse, v.g., Acsadi et al. (1991), *Nature* 332: 815-818, y Wolff et al. (1990), *Science* 247: 1465-1468) o bombardeo de partículas (biolística) (véanse, v.g., Cheng et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 4455-4459, y Zelenin et al. (1993), *FEBS Letts.* 315: 29-32).

Una vez expresados, se pueden purificar los polipéptidos quiméricos de unión a lípidos según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la purificación por afinidad, la precipitación con sulfato de amonio, la cromatografía de intercambio iónico o la electroforesis en gel.

En algunas realizaciones, se puede producir un polipéptido quimérico de unión a lípidos usando un sistema de expresión libre de células o mediante síntesis peptídica de estado sólido.

Polipéptidos de unión a lípidos modificados

En algunas realizaciones de la invención, se proporciona un polipéptido de unión a lípidos que ha sido modificado de tal forma que, cuando se incorpora el polipéptido a una partícula de administración de agentes bioactivos como se ha descrito anteriormente, la modificación aumentará la solubilidad de la partícula o conferirá capacidad de focalización hacia el objetivo. En algunas realizaciones, la modificación permite a los polipéptidos de unión a lípidos de una partícula estabilizar la estructura o conformación en forma de disco de la partícula. En una realización, la modificación incluye la introducción de residuos de cisteína en moléculas de apolipoproteína para permitir la formación de enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares, v.g., por mutagénesis dirigida a sitio. En otra realización, se usa un agente entrecruzante químico para formar uniones intermoleculares entre moléculas de apolipoproteína con objeto de aumentar la estabilidad de las partículas. El entrecruzamiento intermolecular previene o reduce la disociación de las moléculas de apolipoproteína con respecto a las partículas y/o previene el

desplazamiento por moléculas de apolipoproteína en un individuo a quien se administran las partículas.

En otras realizaciones, se modifica un polipéptido de unión a lípidos por derivatización química de uno o más residuos de aminoácidos o por mutagénesis dirigida a sitio, para conferir capacidad de focalización hacia el objetivo a, o reconocimiento por, un receptor de la superficie celular.

Sistema de administración para la administración de un agente bioactivo a un individuo

La invención proporciona un sistema de administración para la administración de un agente bioactivo a un individuo, consistente en partículas de administración de agentes bioactivos como se ha descrito anteriormente y un soporte, eventualmente un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el sistema de administración incluye una cantidad efectiva del agente bioactivo.

Tal como se utiliza aquí, "individuo" se refiere a cualquier procarionta o eucariota al que se desee administrar un agente bioactivo. En algunas realizaciones, el individuo es un procarionta, tal como una bacteria. En otras realizaciones, el individuo es un eucariota, tal como un hongo, una planta, un animal invertebrado, tal como un insecto, o un animal vertebrado. En algunas realizaciones, el individuo es un vertebrado, tal como un humano, un primate no humano, un animal experimental, tal como un ratón o una rata, un animal de compañía, tal como un gato o un perro, o un animal de granja, tal como un caballo, una oveja, una vaca o un cerdo, un ave (es decir, un individuo aviar) o un reptil (es decir, un individuo reptil).

En algunas realizaciones, se formulan las partículas de administración en un soporte adecuado para administración a un individuo. Tal como se usa aquí, "soporte" se refiere a una sustancia relativamente inerte que facilita la administración de un agente bioactivo. Por ejemplo, un soporte puede dar forma o consistencia a la composición o puede actuar como un diluyente. "Soportes farmacéuticamente aceptables" se refiere a soportes que son biocompatibles (es decir, no tóxicos para el huésped) y adecuados para una vía de administración particular para una sustancia farmacológicamente efectiva. Como soportes farmacéuticamente aceptables adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de la penetración cutánea. Se describen ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro, ed., 18ª edición, 1990).

Tal como se usa aquí, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un agente bioactivo suficiente para obtener resultados deseados. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéutica" se refiere a una cantidad de un agente bioactivo suficiente para obtener resultados clínicos beneficiosos, tales como, por ejemplo, reducción o alivio de un síntoma de una enfermedad, reducción o alivio de una infección fúngica o bacteriana, etc.

En algunas realizaciones, el sistema de administración es una composición farmacéutica que incluye una partícula de administración de agente bioactivo y un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye una partícula de administración de agente bioactivo que contiene un agente bioactivo no polipeptídico y un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la partícula de administración de agente bioactivo y el agente bioactivo son no inmunogénicos cuando se administran a un individuo. Se puede medir la inmunogenicidad por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede valorar la inmunogenicidad por un método ELISA, por ejemplo sondando suero de un individuo a quien se han administrado partículas de administración de agentes bioactivos para la unión de anticuerpos a partículas de administración de agentes bioactivos equivalentes unidas a una placa inmunosorbente.

Método de uso

Se discuten aquí métodos para administrar un agente bioactivo a un individuo. Los métodos incluyen la administración de una partícula de administración como se ha descrito anteriormente que incluye un polipéptido de unión a lípidos, una bicapa lipídica y un agente bioactivo, donde el interior de la partícula incluye superficies hidrofóbicas de la bicapa lipídica. Eventualmente, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de las partículas, eventualmente en un soporte farmacéuticamente aceptable. En general, las partículas tienen forma de disco, con un diámetro de aproximadamente 7 a aproximadamente 29 nm, medido por electroforesis nativa en gel en gradiente limitante de poro. Típicamente, el agente bioactivo incluye al menos una región hidrofóbica, que puede integrarse en una región hidrofóbica de la bicapa lipídica.

La vía de administración puede variar según la naturaleza del agente bioactivo que se haya de administrar, el individuo o la condición que se tenga que tratar. Cuando el individuo es un mamífero, la administración es generalmente parenteral. Las vías de administración incluyen, aunque sin limitación, la intravenosa, la intramuscular, la subcutánea, la transmucosal, la nasal, la intratecal, la tópica y la transdérmica. En una realización, se formulan las partículas como un aerosol. Se pueden formular las partículas de administración en una forma farmacéuticamente

aceptable para administración a un individuo, eventualmente en un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona composiciones farmacéuticas en forma de partículas de administración en una solución para administración parenteral. Para preparar tales composiciones, se pueden usar métodos bien conocidos en la técnica, y se pueden usar cualesquiera soportes, diluyentes, excipientes u otros aditivos farmacéuticamente aceptables normalmente usados en la técnica.

Se pueden preparar composiciones farmacéuticas con las partículas de administración de la presente invención por combinación con soportes o diluyentes médicos apropiados. Por ejemplo, se pueden solubilizar las partículas de administración en solventes comúnmente usados en la preparación de soluciones inyectables, tales como, por ejemplo, suero fisiológico, agua o dextrosa acuosa. Se describen otros soportes farmacéuticos adecuados y su formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences, antes citado. Dichas formulaciones pueden ser preparadas en viales estériles que contengan partículas de administración y eventualmente un excipiente en forma de polvo seco o de polvo liofilizado. Antes de su uso, se añade el diluyente fisiológicamente aceptable y se retira la solución mediante jeringa para administración a un individuo.

También se pueden formular partículas de administración para liberación controlada. Tal como se usa aquí, "liberación controlada" se refiere a la liberación de un agente bioactivo de una formulación a un ritmo tal que la concentración en sangre del agente en un individuo se mantiene dentro del rango terapéutico durante un tiempo prolongado, a lo largo de un período de tiempo del orden de horas, días, semanas o más. Se pueden formular partículas de administración en una matriz controlada bioerosionable o no bioerosionable, de la que se conoce bien un número en la técnica. Una matriz de liberación controlada puede incluir un polímero o copolímero sintético, por ejemplo en forma de un hidrogel. Como ejemplos de tales polímeros, se incluyen poliésteres, poliortoésteres, polianhídridos, polisacáridos, poli(fosfoésteres), poliamidas, poliuretanos, poli(imidocarbonatos) y poli(fosfacenos) y poli-lactida-co-glicolida (PLGA), un copolímero de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico). También se pueden usar materiales que contengan colágeno, albúmina y fibrinógeno.

Se pueden administrar las partículas de administración según los métodos aquí descritos para tratar una serie de condiciones, incluyendo, aunque sin limitación, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, condiciones de enfermedad o trastornos metabólicos, o como una medicación profiláctica, por ejemplo para prevenir una infección bacteriana o fúngica (v.g., pre- o post-quirúrgicamente). Se pueden usar las partículas de administración, por ejemplo, para administrar un agente antitumoral (v.g., agente quimioterápico, radionúclido) a un tumor. En una realización, el polipéptido de unión a lípidos incluye un resto que dirige la partícula a un tumor particular. También se pueden usar las partículas de administración para la administración de sustancias nutracéuticas, es decir, un alimento o suplemento dietético que proporciona beneficios para la salud. En algunas realizaciones, se coadministran las partículas de administración con otras terapias convencionales, por ejemplo como parte de un "cóctel" de múltiples fármacos o en combinación con uno o más agentes administrados por vía oral, por ejemplo para el tratamiento de una infección fúngica. También se pueden administrar las partículas de administración como insecticidas o herbicidas.

Se discute aquí un método para el tratamiento de una infección fúngica en un individuo. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente antifúngico en un soporte farmacéuticamente aceptable al individuo, donde el agente antifúngico se incorpora a una partícula que incluye un polipéptido de unión a lípidos y una bicapa lipídica, donde el interior de la bicapa lipídica es hidrofóbico. En una realización, el agente antifúngico es AmB, incorporada al interior hidrofóbico de la bicapa lipídica. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a lípidos es una proteína quimérica que incluye un resto de focalización hacia el objetivo y/o un resto con actividad biológica. En una realización, el polipéptido de unión a lípidos incluye como resto de focalización hacia el objetivo el péptido del factor de apareamiento α de levadura. En otra realización, el polipéptido de unión a lípidos incluye el péptido antimicrobiano histatina 5.

También se discute un método de tratamiento de un tumor en un individuo. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterápico en partículas de administración de agentes bioactivos como se ha descrito anteriormente, en un soporte farmacéuticamente aceptable. En una realización, el agente quimioterápico es la camptotecina. Un componente polipeptídico de unión a lípidos de las partículas de administración puede incluir un resto de focalización hacia el objetivo para dirigir las partículas a las células tumorales. En una realización, se une péptido intestinal vasoactivo (VIP) al polipéptido de unión a lípidos. Como las células del cáncer de mama sobreexpresan con frecuencia el receptor de VIP, en una realización se usan partículas de administración de agente bioactivo que contienen camptotecina y quimeras de polipéptido de unión a lípidos-VIP en un método de tratamiento para el cáncer de mama.

Focalización hacia el objetivo

Una partícula de administración de la invención puede incluir una funcionalidad de focalización hacia el objetivo, por ejemplo para dirigir las partículas a un tipo celular o tisular particular, o al propio agente infeccioso. En algunas

realizaciones, la partícula incluye un resto de focalización hacia el objetivo unido a un componente polipeptídico de unión a lípidos o lipídico. En algunas realizaciones, el agente bioactivo que se incorpora a la partícula tiene una capacidad de focalización hacia el objetivo.

5 En algunas realizaciones, dando por ingeniería propiedades de reconocimiento de receptores a un polipéptido de unión a lípidos, tal como una molécula de apolipoproteína, se pueden dirigir las partículas a un receptor de la superficie celular específico. Por ejemplo, se pueden dirigir partículas de administración de agentes bioactivos a un tipo celular particular que se sabe alberga un tipo particular de agente infeccioso, por ejemplo modificando el componente polipeptídico de unión a lípidos de las partículas para hacerlo capaz de interactuar con un receptor sobre la superficie del tipo celular abordado.

10 En un aspecto, se puede usar una estrategia de focalización mediada por receptores para administrar agentes antileishmania a los macrófagos, que son el sitio primario de infección para parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Como ejemplos de tales especies, se incluyen *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*. Se pueden dirigir partículas de administración de agentes bioactivos que contengan un agente antileishmania a macrófagos alterando el componente polipeptídico de unión a lípidos de las partículas para conferir reconocimiento por el receptor depurador de clase A (SR-A) endocítico de macrófagos. Por ejemplo, se puede incorporar una apolipoproteína que haya sido química o genéticamente modificada para interactuar con SR-A a partículas de administración que contengan uno o más agentes bioactivos que sean efectivos frente a las especies de *Leishmania*, tales como, por ejemplo, AmB, un antimonial pentavalente, y/o hexadecilfosfolina. Se puede usar la focalización de partículas de administración que contengan un agente antileishmania específicamente hacia macrófagos como medio de inhibición del crecimiento y la proliferación de *Leishmania spp.*

15 Se puede administrar una partícula de administración de agentes bioactivos dirigida a SR-A que contenga AmB a un individuo que necesite tratamiento para una infección por *Leishmania*. En otro aspecto, se administra otro agente antileishmania, tal como hexadecilfosfolina, antes, al mismo tiempo o después del tratamiento con las partículas que contienen AmB.

20 En algunas realizaciones, se consigue la focalización modificando un polipéptido de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína, que se ha de incorporar a la partícula de administración de agentes bioactivos, confiriendo así capacidad de unión a SR-A a la partícula. En algunas realizaciones, se consigue la focalización alterando la densidad de carga del polipéptido de unión a lípidos por modificación química de uno o más residuos de lisina, por ejemplo con malondialdehído, anhídrido maleico o anhídrido acético, a pH alcalino (véase, v.g., Goldstein et al. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 241-260). En una realización, se modifica Apo B-100 o una forma truncada de la misma, tal como el 17% N-terminal de ApoB-100 (residuos 1-782 de apoB-17), por reacción con malondialdehído. En otras realizaciones, también se puede modificar químicamente una molécula de apolipoproteína, tal como cualquiera de las apolipoproteínas aquí descritas, mediante, por ejemplo, acetilación o maleilación, e incorporarla a una partícula de administración de agentes bioactivos que contenga un agente antileishmania.

25 En otras realizaciones, se confiere capacidad de unión a SR-A a una partícula de administración modificando el polipéptido de unión a lípidos por mutágenesis dirigida a sitio para substituir uno o más aminoácidos de carga positiva con un aminoácido neutro o de carga negativa.

30 En otras realizaciones, se confiere reconocimiento de SR-A preparando un polipéptido quimérico de unión a lípidos que incluye una extensión N- o C-terminal que tiene un ligando reconocido por SR-A o una secuencia de aminoácidos con una alta concentración de residuos de carga negativa. Una extensión de polipéptido de carga negativa no se sentirá atraída hacia la superficie lipídica de la partícula de administración de agentes bioactivos, haciéndola así más accesible al sitio de unión a ligando del receptor.

50 **Métodos para preparar partículas de administración de agentes bioactivos**

La invención proporciona métodos para formular una partícula de administración de agentes bioactivos. En una realización, se proporciona un procedimiento que incluye la adición de moléculas de polipéptido de unión a lípidos a una mezcla que incluye lípidos formadores de bicapa y moléculas de agente bioactivo.

55 En algunas realizaciones, la mezcla de lípidos-agente bioactivo también incluye un detergente, tal como, por ejemplo, colato de sodio, ácido cólico u octilglucósido, y el procedimiento incluye además la eliminación del detergente después de haber añadido el polipéptido de unión a lípidos. Típicamente, se elimina el detergente por diálisis o filtración por gel. En una realización, el procedimiento incluye la combinación de lípidos formadores de bicapa y moléculas de agente bioactivo en un solvente para formar una mezcla de –agente bioactivo, el secado de la mezcla para eliminar el solvente (v.g., bajo una corriente de N₂ y/o por liofilización), el contacto de la mezcla secada con una solución que incluye un detergente para formar una mezcla de lípidos-agente bioactivo-detergente, la adición de moléculas de polipéptido de unión a lípidos a esta mezcla y la eliminación después del detergente.

60

En algunas realizaciones, se preparan las partículas usando un procesador microfluidizador. Este procedimiento emplea alta presión, forzando a los componentes entre sí en una cámara de reacción.

5 En algunas realizaciones, se preparan las partículas por incubación de una suspensión de vesículas lipídicas que contienen un agente bioactivo en presencia de un polipéptido de unión a lípidos, tal como una apolipoproteína. En una realización, se sonica la suspensión.

10 En otras realizaciones, se preparan partículas de administración a partir de una dispersión de vesículas preformadas. Se hidratan lípidos, v.g., fosfolípidos, con tampón y se dispersan por agitación o sonicación. Se añade a la dispersión de vesículas de bicapa lipídica agente bioactivo solubilizado en un solvente adecuado para formar un complejo de lípidos-agente bioactivo. En algunas realizaciones, el solvente es volátil o dializable para su conveniente eliminación tras la adición de agente bioactivo a la dispersión de vesículas de bicapa lipídica. Después de volver a agitar, se añade polipéptido de unión a lípidos y se incuba la muestra, se mezcla por agitación y/o se sonica. Típicamente, se incuban las vesículas y la apolipoproteína a, o en proximidad a, la temperatura de transición de fase cristalina de gel a líquido del lípido formador de bicapa o de la mezcla de lípidos formadores de bicapa particulares que se estén utilizando. Se puede determinar la temperatura de transición de fase por calorimetría.

20 Preferiblemente, se usa una composición adecuada de lípidos formadores de bicapa de tal forma que, al dispersarse en medios acuosos, las vesículas lipídicas proporcionen un ambiente adecuado para la transición de un agente bioactivo de un solvente de soporte a un medio acuoso sin precipitación o separación de fase del agente bioactivo. Las vesículas de bicapa lipídica preformadas son también preferiblemente capaces de sufrir transformación inducida por polipéptidos de unión a lípidos para formar las partículas de administración de la invención. Además, el complejo de lípidos-agente bioactivo preferiblemente retiene propiedades de las vesículas lipídicas que permiten la transformación en partículas de administración de agentes bioactivos por incubación con un polipéptido de unión a lípidos en condiciones apropiadas. La combinación única de la organización del complejo sustrato lipídico-agente bioactivo y las propiedades del polipéptido de unión a lípidos se combinan para crear un sistema mediante el cual, en condiciones apropiadas de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de lípidos-agente bioactivo-polipéptido de unión a lípidos, se produce una reorganización estructural ternaria de estos materiales, donde se crean bicapas lipídicas estables que circunscriben al polipéptido de unión a lípidos con un agente bioactivo incorporado al medio lipídico de la bicapa. Para una discusión del efecto del pH, de la fuerza iónica y de la concentración del polipéptido de unión a lípidos sobre la capacidad de los polipéptidos de unión a lípidos para inducir la transformación de diferentes tipos de vesículas fosfolipídicas en partículas con forma de disco, véase Weers et al. (2001), Eur. J. Biochem. 268: 3728-35.

35 Las partículas preparadas por cualquiera de los procedimientos anteriores pueden ser además purificadas, por ejemplo por diálisis, centrifugación en gradiente de densidad y/o cromatografía de permeación por gel.

40 En un método de preparación para la formación de partículas de administración de agentes bioactivos, se incorpora a las partículas preferiblemente al menos aproximadamente un 70, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 90, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 95, por ciento del agente bioactivo utilizado en el procedimiento.

45 La invención proporciona partículas de administración de agentes bioactivos preparadas por cualquiera de los métodos anteriores. En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una partícula de administración preparada por cualquiera de los métodos anteriores y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Almacenamiento y estabilidad

50 Las partículas de la invención son estables durante largos períodos de tiempo bajo una variedad de condiciones (véase, por ejemplo, la Fig. 5). Se pueden almacenar las partículas, o composiciones que contengan las partículas, de la invención a temperatura ambiente, refrigeradas (v.g., aproximadamente 4°C) o congeladas (v.g., de aproximadamente -20°C a aproximadamente -80°C). Se pueden almacenar en solución o desecadas (v.g., liofilizadas). Se pueden almacenar las partículas de administración de agentes bioactivos en un estado liofilizado bajo atmósfera inerte, congeladas o en solución a 4°C. Se pueden almacenar las partículas en un medio líquido, tal como un tampón (v.g., tampón fosfato u otro adecuado), o en un soporte, tal como, por ejemplo, un soporte farmacéuticamente aceptable, para uso en métodos de administración de un agente bioactivo a un individuo. Alternativamente, se pueden almacenar las partículas en forma seca, liofilizada, y reconstituir luego en medio líquido antes de su uso.

60 Kits

Se pueden envasar los reactivos y partículas aquí descritos en forma de kit. En un aspecto, la invención proporciona

5 un kit que incluye partículas de administración y/o reactivos útiles para preparar partículas de administración, en un envase adecuado. Los kits de la invención incluyen cualquiera de los siguientes, por separado o en combinación: polipéptidos de unión a lípidos (v.g., apolipoproteínas), fosfolípidos, agentes bioactivos, vectores, reactivos, enzimas, células huésped y/o medio de crecimiento para la clonación y/o la expresión de polipéptidos de unión a lípidos recombinantes (v.g., apolipoproteínas recombinantes) y/o quimeras de polipéptidos de unión a lípidos (v.g., quimeras de apolipoproteínas), y reactivos y/o soportes farmacéuticamente aceptables para formular partículas de administración para administración a un individuo.

10 Cada reactivo o formulación es suministrado en forma sólida, tampón líquido o soporte farmacéuticamente aceptable que sea adecuado para almacenamiento de inventario, o eventualmente para intercambio o adición a un medio de reacción, de cultivo o inyectable. Se proporciona un envase adecuado. Tal como se usa aquí, "envase" se refiere a una matriz o material sólido habitualmente utilizado en un sistema y capaz de mantener dentro de límites fijados uno o más de los reactivos o componentes (v.g., partículas de administración) para uso en un método para administración de un agente bioactivo o uno o más reactivos para preparar o formular partículas de administración (v.g., moléculas de apolipoproteína, fosfolípidos, agentes bioactivos). Dichos materiales incluyen, aunque sin limitación, botellas de vidrio y plástico (v.g., polietileno, polipropileno y policarbonato), viales, papel, plástico y sobres laminados con lámina de plástico, y similares.

20 Un kit puede eventualmente proporcionar componentes adicionales útiles en los métodos y procedimientos de formulación de la invención, tales como tampones, superficies reactivas o medios de purificación de partículas de administración.

25 Además, los kits eventualmente incluyen materiales de etiquetado y/o instrucciones o interpretación que proporcionan indicaciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención, como la preparación, la formulación y/o el uso de partículas de administración. Aunque los materiales de instrucciones comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no se limitan a estos formatos. Esta invención contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, aunque sin limitación, medios de almacenamiento electrónicos (v.g., discos, cintas, cartuchos y chips magnéticos), medios ópticos (v.g., CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan dichos materiales de instrucciones.

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, la invención.

35 Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación y caracterización de partículas de ApoA-I-Fosfolípido-Anfotericina B

Preparación de ApoA-I recombinante

40 Se preparó Apo-A-I recombinante como describen Ryan et al. (2003), Protein Expression and Purification 27: 98-103, y se utilizó para preparar partículas de Apo-A-I-fosfolípido-AmB, como se describe a continuación.

Preparación de partículas de ApoA-I-fosfolípido-AmB

45 Se prepararon partículas de ApoA-I-fosfolípido-AmB como sigue:

50 Se disolvieron dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) en una razón molar 7:3 en cloroformo:metanol (3:1, v/v). A 10 mg de la mezcla DMPC/DMPG, se añadieron 0,25 ml de AmB (2 mg/ml, solubilizada en cloroformo acidificado:metanol (3:1, v/v)). Se secó la mezcla bajo una corriente de N₂ gaseoso para crear una fina película sobre la pared del recipiente. Se sometió entonces la mezcla desecada a liofilización durante dieciséis horas para eliminar las trazas de solvente.

55 Se resuspendió la mezcla lipídica desecada en 0,5 ml de tampón Tris-solución salina (base Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8) y se agitó la mezcla vorticialmente durante 30 segundos.

60 A la mezcla lipídica resuspendida, se añadieron 0,5 ml de colato de sodio 22 mM y se agitó vorticialmente durante 3 minutos. Se incubó esta mezcla a 37°C con agitación vorticial cada 10 minutos durante 1,25 horas o hasta que la mezcla fuese transparente. A la solución transparente, se añadieron 2 ml de ApoA-I recombinante aislada, preparada como se describe en el Ejemplo 1, a una concentración de 1,5 mg/ml, y se incubó la mezcla a 37°C durante 1 hora adicional. Para eliminar el colato de sodio, se sometió la mezcla a diálisis frente a 4 litros de Tris-solución salina a 4°C durante 72 horas con un cambio de tampón de diálisis cada 24 horas.

Se purificó además la muestra por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Se ajustó la solución a una

densidad de 1,30 g/ml por adición de KBr sólido en 1,5 ml. Se transfirió la muestra a un tubo de centrifuga de 3 ml, se cubrió con una capa de solución salina y se centrifugó a 275.000 x g durante 3 horas en una centrifuga Beckman L7-55.

5 Estabilidad de las partículas

Las partículas preparadas según este procedimiento eran estables durante más de 3 meses en forma liofilizada.

10 Caracterización de las partículas

10 Se realizaron barridos en el UV/visible para las partículas de ApoA-I-fosfolípido, preparadas como se ha descrito anteriormente pero sin adición de AmB, y se compararon con barridos para las partículas que contenían AmB. La Fig.1 muestra el barrido para partículas que no incluyen AmB. El único pico observado era un pico de proteína a aproximadamente 280 nm. La Fig. 2 muestra el barrido para partículas que contienen AmB preparadas como se ha descrito anteriormente. Además del pico a aproximadamente 280 nm, se observaron una serie de picos adicionales en la región de 300-400 nm del espectro, lo que confirma la presencia de AmB. La AmB libre es insoluble en medios acuosos y tiene propiedades espectrales diferentes a las observadas en la Fig. 2. Madden et al. (1990), Chemistry and Physics of Lipids, 52: 189-98.

20 Los estudios de caracterización revelaron que la ApoA-I, el fosfolípido y la AmB migran como una población de partículas discretas cuando se someten a ultracentrifugación en gradiente de densidad (Fig. 3). Los complejos flotan a una densidad característica en el gradiente que depende de la proporción proteína/lípido en las partículas.

25 Además, la electroforesis en gel en gradiente en condiciones no desnaturizantes reveló que el complejo principal generado es de tamaño uniforme, exhibiendo un diámetro de Stokes de 8,5 nm (Fig. 4). El análisis de las partículas aisladas reveló que no se producía una desviación significativa de las razones molares originales de AmB, fosfolípido y apolipoproteína.

30 **Ejemplo 2.** Actividad antifúngica de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB frente a *Saccharomyces cerevisiae*

35 Se prepararon partículas de ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB como se describe en el Ejemplo 1 y se utilizaron para determinar la actividad antifúngica de los complejos. Se dejaron crecer cultivos de *S. cerevisiae* en medio YPD en presencia de cantidades variables de partículas de ApoA-I-DMPC/DMPG-AmB (0-25 µg AmB/ml). Se dejaron crecer los cultivos durante 16 horas a 30°C y se monitorizó el grado de crecimiento del cultivo espectrofotométricamente. Como se muestra en la Fig. 8, las partículas que contenían AmB eran extremadamente efectivas en la inhibición del crecimiento fúngico de un modo dependiente de dosis.

40 **Ejemplo 3.** Estabilidad a largo plazo de las partículas de administración de agentes bioactivos

45 Se preparó el dominio ApoE3NT-terminal (ApoE3NT) recombinante como en Fisher et al. (1997), Biochem. Cell. Biol. 75: 45-53. Se prepararon partículas que contenían ApoE3NT-AmB por el método de diálisis del colato descrito en el Ejemplo 1 y se utilizaron para valorar la estabilidad a largo plazo.

50 La Fig. 5 muestra un gel plano en gradiente del 4-20% de PAGE nativa de partículas almacenadas en tampón fosfato a 4°C (calle 1), almacenadas en tampón fosfato a -20°C (calle 2) o congeladas en tampón fosfato a -80°C, liofilizadas y redisueltas en H₂O antes del análisis. El tamaño y la movilidad de las partículas que contenían AmB no resultaron afectados por la congelación y la descongelación, o por la liofilización y la resolubilización, lo que indica que las partículas conservaban su integridad en estas condiciones. Éstos son parámetros importantes con respecto a la ampliación a mayor escala y el almacenamiento a largo plazo de las partículas de administración de AmB.

Ejemplo 4. Preparación de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB con POPC

55 Se prepararon partículas de ApoA-I-POPC utilizando el método de diálisis del colato descrito en el Ejemplo 1. Se muestra un análisis en gel en gradiente de PAGE nativa de las partículas de ApoA-I-POPC en la Fig. 4. Se muestran partículas sin AmB en la calle 1 y se muestran partículas con AmB en la calle 2. El gel indica que la incorporación de AmB a las partículas no altera su tamaño. Sin embargo, el gel indica que las partículas que contienen POPC son de tamaño diferente a las partículas DMPC/DMPG, mostradas en la calle 3.

60 **Ejemplo 5.** Preparación de partículas que contienen AmB con un procesador microfluidizador

Se combinaron ApoA-I, AmB, PC de huevo, DPPG y colesterol en un soporte de muestras de microfluidizador y se pasaron a través de la cámara de reacción del procesador microfluidizador a 18.000 psi. Se recogió la solución

resultante y se caracterizó en términos de formación de partículas, incorporación de sustancias hidrofóbicas, tamaño y estabilidad. Se obtuvieron partículas que contenían AmB de aproximadamente 16 nm de diámetro, que eran estables a la liofilización y a la reconstitución con solventes acuosos.

5 **Ejemplo 6.** Preparación de partículas que contienen AmB a partir de vesículas fosfolipídicas

Se preparó una suspensión de vesículas fosfolipídicas que contenían AmB añadiendo una alícuota de una solución de 20-40 mg/ml de AmB en DMSO, correspondiente a 2,5 mg de AmB, a una dispersión acuosa de fosfolípidos preformada que contenía una proporción molar de DMPC:DMPG 7:3. Se incubaron las vesículas a la temperatura de transición de fase de gel a líquido de los fosfolípidos (aproximadamente 24°C). La adición de 4 mg de apolipoproteína condujo a una disminución dependiente del tiempo en la turbidez de la muestra, consistente con la formación de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB. Se consiguió una transparencia total de la muestra por sonicación suave en baño a 21-25°C durante 1-20 minutos o en 4-16 horas sin sonicación a 24°C. Las partículas resultantes exhibían >90% de eficiencia en la incorporación de AmB, es decir, el porcentaje de material de partida de AmB que se recupera en partículas de administración, y no se perdió ningún material por filtración, centrifugación o diálisis. Otras pruebas revelaron que se pueden conseguir resultados similares ajustando la concentración de AmB a hasta 5 mg/10 mg de fosfolípido. Este procedimiento funcionaba igualmente bien con cualquiera de cinco apolipoproteínas estudiadas (ApoA-I, ApoE3NT, ApoIII de *Bombyx mori* y una forma variante de la ApoA-I humana que incluye una extensión C-terminal que incluye el péptido antifúngico, Histatina 5, y una forma variante de la ApoA-I humana que incluye una extensión C-terminal que incluye el péptido del factor de apareamiento α de *S. cerevisiae*).

La ultracentrifugación en gradiente de densidad de partículas que contienen ApoA-I o ApoE3NT reveló una única población de partículas que flotaban a una densidad característica en el rango de 1,21 g/ml, consistente con la formación de complejos de lípidos-proteínas. La caracterización de las fracciones obtenidas tras la centrifugación en gradiente de densidad reveló que el fosfolípido, la AmB y la apolipoproteína migraban a la misma posición en el gradiente, lo cual es consistente con la formación de partículas que contienen AmB.

La comparación de la migración relativa de partículas que contienen ApoA-I-AmB con patrones conocidos en PAGE nativa indicaba que más de un 90% de las partículas tenían un diámetro de Stokes de aproximadamente 8,5 nm. Este valor es similar al de las partículas generadas en ausencia de AmB, lo que indica que la adición de este agente bioactivo no alteraba significativamente la distribución de tamaño de las partículas.

Como medida de la estabilidad global de las partículas de administración de agentes bioactivos que contienen ApoA-I-AmB, se congelaron las partículas a -20°C o se liofilizaron. La congelación/descongelación no tuvo efectos sobre la distribución de tamaño de las partículas. De igual modo, el sometimiento de las partículas a liofilización y redisolución en H₂O no afectó a la distribución de tamaño o al aspecto de la muestra.

Estos datos sugieren fuertemente que la AmB, los fosfolípidos y la apolipoproteína se combinaban para formar una población homogénea de partículas de administración de agentes bioactivos en donde la AmB se integra totalmente en la porción de bicapa de la partícula. El análisis espectrofotométrico de las partículas que contienen AmB reveló un conjunto característico de picos en el rango visible que son consistentes con la solubilización de la AmB en la partícula de administración de agentes bioactivos.

45 **Ejemplo 7.** Comparación de partículas que contienen AmB preparadas como en el Ejemplo 6 con partículas preparadas por un procedimiento alternativo

La incorporación de agente bioactivo a partículas de administración de agentes bioactivos utilizando el método descrito en el Ejemplo 6 fue comparada con la incorporación a partículas de "neo-HDL" preparadas según Shouten et al. (1993), Molecular Pharmacology 44: 486-492, como sigue: Se mezclaron 3 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo, 0,9 mg de colesterol y 1,5 mg de AmB, disueltos en cloroformo, en un vial de vidrio de 20 ml y se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno. Se añadieron 10 ml de tampón de sonicación (Tris HCl 10 mM, pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM y 0,025% de NaN₃), desgasificado y saturado con nitrógeno, y se sonicaron los contenidos del vial con un Macrotip (rendimiento medio de 14 μ m) bajo una corriente de nitrógeno. Se mantuvo la temperatura por encima de 41°C y por debajo de 50°C. Se detuvo la sonicación después de 60 minutos y se ajustó la temperatura a 42°C. Se continuó con la sonicación y se añadieron 20 mg de ApoA-I, disueltos en 2 ml de urea 4M, en diez porciones iguales a lo largo de un período de 10 minutos. Después de haber añadido toda la proteína, se continuó con la sonicación durante 30 min. a 42°C.

Se centrifugó entonces la mezcla de sonicación durante 3 minutos para eliminar las partículas grandes y el material insoluble y se analizó el sobrenadante por espectrofotometría UV/Visible para determinar la cantidad de anfotericina B solubilizada en las partículas producto. Se observó que la solución era ligeramente opaca. Se escaneó la muestra de 250 nm a 500 nm. Con fines comparativos, se examinaron partículas que contenían AmB preparadas por el

procedimiento descrito en el Ejemplo 6. Los resultados son mostrados en la Fig. 12. La región del espectro que surge de AmB (300-500 nm) es bastante distinta entre las dos muestras. Mientras que las partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB generadas usando el protocolo descrito en el Ejemplo 6 tenían máximos de absorbancia característicos intensos que indican solubilización e incorporación de AmB en las partículas (Madden et al., antes citado) (Fig. 12B), la muestra preparada según Schouten et al. no dio lugar a estos máximos espectrales característicos (Fig. 12A). Ciertamente, el espectro obtenido es muy similar al descrito por Madden et al., antes citado, para una dispersión acuosa de AmB en ausencia de lípido. Así, no se incorporó la AmB a partículas lipídicas utilizando este procedimiento, mientras que el procedimiento descrito en el Ejemplo 6 dio lugar a una incorporación significativa de AmB.

Ejemplo 8. Comparación de la actividad antifúngica de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB con una formulación liposomal de AmB

Se comparó la actividad antifúngica de partículas de ApoA-I-AmB, preparadas como en el Ejemplo 6, y de una formulación liposomal comercial de AmB, AmBisome[®], con respecto a su capacidad para inhibir el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*. Los datos de la Fig. 10 muestran que las partículas de administración de agentes bioactivos de Apo-A-I-AmB inhibían más efectivamente el crecimiento de *S. cerevisiae* que la misma cantidad de AmB formulada como AmBisome[®]. Las partículas de administración de agentes bioactivos de Apo-A-I-AmB alcanzaron un 90% de inhibición del crecimiento a 1 µg/ml, mientras que este nivel de inhibición requería 25 µg/ml de AmBisome[®].

También se comparó la actividad antifúngica de partículas de ApoA-I-AmB y de AmBisome[®] frente a dos especies de hongos patógenos, *Candida albicans* (*C. albicans*) y *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), en ensayos de microtitulación de células enteras en caldo. Como control, se estudiaron también partículas sin AmB. En la Tabla 1 se muestran los resultados.

Tabla 1

Inhibición por Anfotericina B del crecimiento de hongos patógenos			
DE ₉₀ (µg/ml)			
Organismo	AmBisome	Partículas de administración con AmB	Partículas control sin AmB
<i>Candida albicans</i>	0,8	0,1	Sin inhibición
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,6	0,2	Sin inhibición

Los resultados obtenidos revelaron que las partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB eran efectivas frente a ambas especies de hongos patógenos, a una concentración inferior a AmBisome[®]. Las partículas control que carecían de AmB no eran efectivas. Las partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB exhibían una DE₉₀ (concentración a la que se observa un 90% de inhibición del crecimiento) para *C. albicans* a una concentración de 0,1 µg/ml, mientras que se requerían 0,8 µg/ml de AmBisome[®] para alcanzar el mismo nivel de inhibición del crecimiento. Para *A. fumigatus*, las partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB inhibían un 90% del crecimiento fúngico a una concentración de 0,2 µg/ml, mientras que se requerían 1,6 µg/ml de AmBisome[®] para alcanzar el mismo efecto.

En otra realización, se compararon partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB y que contenían apolipoproteína III como polipéptido de unión a lípidos con AmBisome[®] en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento de tres especies de hongos patógenos, *C. albicans*, *A. fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*). En la Tabla 2 se muestran los datos.

Tabla 2

Inhibición por Anfotericina B del crecimiento de hongos patógenos			
DE ₉₀ (µg/ml)			
Organismo	AmBisome	Partículas de administración con AmB	Partículas control sin AmB
<i>Candida albicans</i>	0,4	0,03	Sin inhibición
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,5	0,1	Sin inhibición
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,31	0,06	Sin inhibición

Las partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB inhibían un 90% del crecimiento de *C. albicans* a 0,03 µg/ml. Se obtuvo un DE₉₀ correspondiente de 0,4 µg/ml con AmBisome[®]. En el caso de *A. fumigatus*, las partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB inhibían un 90% del crecimiento fúngico a 0,1 µg/ml, mientras que se requería una concentración de 2,5 µg/ml de AmBisome[®] para alcanzar el mismo efecto. De un modo similar, las partículas que contenían AmB eran efectivas en la inhibición del crecimiento de *C. neoformans* a una concentración de AmB cinco veces menor que AmBisome[®].

Todas las muestras estudiadas eran solubles en el medio RPMI usado para los experimentos y no se observó precipitación o interferencia en ninguna de las muestras estudiadas frente a ninguna de las especies de hongos. Estos datos sugieren que una formulación de AmB en las partículas de administración de agentes bioactivos de la invención tiene una actividad antifúngica más potente que una formulación liposomal.

Ejemplo 9. Incorporación de camptotecina a partículas de administración de agentes bioactivos

Se prepararon partículas de administración de agentes bioactivos que contenían camptotecina como sigue: Se dispersó una razón molar 7:3 de DMPC:DMPG (5 mg en total) en tampón (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) por agitación vorticial durante 1 minuto para generar una dispersión de vesículas de bicapa fosfolipídica. Se añadieron 10 μ l de una solución de 10 mg/ml de camptotecina en DMSO a la dispersión de bicapa fosfolipídica. Se añadieron entonces 2 mg de apolipoproteína A-I humana recombinante (0,5 ml de una solución de 4 mg/ml en fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0) y se sometió luego la muestra a sonicación. Se centrifugó entonces la muestra clarificada a 13.000 x g durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C.

En la Fig. 11 se muestra un espectro de fluorescencia de las partículas que contenían camptotecina, en comparación con camptotecina solubilizada en dodecilsulfato de sodio (SDS). Se obtuvieron las mediciones de fluorescencia en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS 50B a una longitud de onda de excitación de 360 nm con emisión monitorizada de 400 a 600 nm. El desplazamiento azul en el máximo de emisión de fluorescencia provocado por la camptotecina en micelas de SDS (Fig. 11A) en comparación con la camptotecina incorporada a partículas de administración de agentes bioactivos (Fig. 11B) sugiere que el fármaco se localiza en un ambiente más hidrofóbico en las micelas frente a las partículas de administración.

Ejemplo 10. Microscopía electrónica de fractura por congelación de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB

Se preparó una preparación de partículas de administración de agentes bioactivos que contenían AmB para microscopía electrónica de fractura por congelación como sigue: Se apagó una muestra de partículas de administración de agentes bioactivos de AmB en DMPC:DMPG (razón molar 7:3) (3 mg/ml de proteína), preparada como en el Ejemplo 6, utilizando una técnica en sándwich y propano enfriado con nitrógeno líquido. Se guardó la muestra criofijada en nitrógeno líquido durante menos de 2 horas antes de su procesado. Se llevó a cabo el procedimiento de fracturación en un equipo de congelación-decapado JOEL JED-900 y se siguieron de cerca los planos de fractura expuestos con Pt durante 30 segundos en un ángulo de 25-35 grados, y con carbono durante 35 segundos (2 kV/60-80 mA, 1×10^{-5} Torr). Se limpiaron las réplicas producidas de este modo con HNO₃ fumante concentrado durante 24 horas, seguido de agitación repetida con cloroformo/metanol (1:1 en volumen) fresco al menos 5 veces. Se examinaron las réplicas limpiadas de este modo en un microscopio electrónico JOEL 100 CX o Philips CM 10.

Se muestra en la Fig. 9 una micrografía electrónica obtenida por fractura por congelación de partículas que contenían AmB como se ha descrito anteriormente. Las micrografías electrónicas tomadas de varias preparaciones de fractura por congelación indican la presencia de pequeños complejos de proteína-lípido en alta concentración. Los diámetros aparentes varían aproximadamente de 20 a 60 nm, con una elevada frecuencia a alrededor de 40 nm. El diámetro aparente de las partículas observado por microscopía electrónica de fractura por congelación es mayor que los valores obtenidos por electroforesis nativa en gel en gradiente limitante de poro. La diferencia puede deberse al efecto de la manipulación de la muestra o al procedimiento de tinción utilizado para visualizar las partículas por microscopía electrónica.

Los complejos substancialmente esféricos no exhiben caras de fractura cóncavas o convexas (sombra al frente y detrás de la estructura, respectivamente), como son características para los liposomas. Además, no se observó evidencia de estructuras micelares.

Ejemplo 11. Valoración *in vivo* de la actividad antifúngica de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB en ratones inmunocompetentes

Se valora la actividad antifúngica *in vivo* de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB como sigue:

Animales

Se albergan y mantienen ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad (20-25 g) en condiciones de laboratorio estándar.

Estudio de toxicidad

5 Grupos de tres ratones reciben cada uno una dosis (v.g., 1, 2, 5, 10 ó 15 mg/kg de AmB) en partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB, o partículas control sin AmB, en solución salina tamponada a pH 7,4 con fosfato de sodio 10 mM. Se administra una única dosis en un volumen de 0,1 ml intraperitonealmente. Los estudios preliminares han indicado que las partículas de administración de agentes bioactivos son totalmente solubles en estas condiciones.

10 Tras la inyección, se observa a los ratones en cuanto a cualquier reacción general, por ejemplo movimiento o postura anormal, dificultad respiratoria, pelaje erizado o incapacidad para obtener alimento o bebida. La observación en cuanto a anormalidad o mortalidad comienza inmediatamente después de la administración y continúa dos veces al día durante siete días. Se registra el peso corporal diariamente durante el mismo período.

15 Se recoge sangre de los ratones antes de la eutanasia. Se estudia la sangre en cuanto a enzimas hepáticas, tales como la lactato deshidrogenasa, para valorar el grado de daños específicos del hígado

Eficacia de las partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB en el tratamiento del *Cryptococcus* sistémico

20 Se determina el rango terapéutico de las partículas que contienen AmB y se compara con AmBisome® como sigue:

25 Se cultiva un aislado clínico de *C. neoformans* que es susceptible a la AmB y se prepara como inóculo para infección a una concentración de 2×10^6 conidios/ml. Cada ratón recibe un inóculo de 1×10^5 conidios en 0,05 ml de solución salina normal intracranealmente bajo anestesia general.

30 Se administran los agentes antifúngicos intraperitonealmente en volúmenes de 0,1 ml diariamente durante 5 días, comenzando 2 horas después de la infección. Se determina la dosificación de AmB utilizada en base a los estudios de toxicidad antes descritos. Un grupo de ratones de tratamiento recibe AmBisome®, un grupo de tratamiento recibe partículas de administración de agentes bioactivos que contienen AmB y un grupo control no recibe ninguna terapia.

35 Se monitoriza a los ratones infectados dos veces al día y se registra cualquier signo de enfermedad o mortalidad durante hasta 28 días. Se registra el peso corporal diariamente durante el mismo período de tiempo. Se sacrifican los animales moribundos que no consiguen moverse normalmente o ingerir alimento o bebida. En base al resultado de estos estudios, se realiza un segundo grupo de estudios para verificar y reproducir los hallazgos. Se puede ajustar la dosis de AmB empleada, así como el número de ratones en los grupos de control y de tratamiento, para reflejar el conocimiento obtenido del experimento previo.

Determinación de la carga fúngica tisular

40 Los ratones son sacrificados un día después del último día de tratamiento. Se extraen los riñones y los cerebros asépticamente y se pesan. Se homogeneizan los tejidos y se diluyen seriadamente en solución salina normal. Se cultivan los homogenados durante 48 horas en placas de PDA (agar dextrosa de patata) para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Se determina la carga fúngica de UFC/gramo de tejido.

45 Análisis estadísticos

Se comparan las diferencias en supervivencia y UFC medias en riñón o cerebro utilizando pruebas estadísticas según sea apropiado.

50 Estudio farmacocinético

55 Se recogen muestras de sangre, hígado, riñón, pulmón y líquido cerebroespinal de los ratones infectados en puntos de tiempo de 10 minutos, 2, 8 y 24 horas después de la inyección intravenosa de partículas de administración de agentes bioactivos de AmB o AmBisome® a dosis de 0,8 y 2,0 mg/kg. Mientras los ratones están bajo anestesia general, se recoge sangre entera de los vasos axilares. Se realiza una toracotomía y se perfunden muestras de tejido con solución salina normal y se extraen luego quirúrgicamente: Se homogeneizan los tejidos con metanol que contiene 1-amino-4-nitronaftaleno. Se conservan el suero y los sobrenadantes de los homogenados tisulares hasta su análisis. Se determina la concentración de AmB en cada muestra por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), según se describe en Granich et al. (1986), *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 584-88. Resumiendo, se combinan las muestras de suero (0,1 ml) con 1,0 ml de metanol que contiene 1,0 mg de un patrón interno, el 1-amino-4-nitronaftaleno, por ml y se mezclan por agitación vorticial. Tras centrifugación, se seca el sobrenadante bajo presión reducida, seguido de redisolución con 0,2 ml de metanol para inyección en una columna de HPLC (fase invertida C₁₈). Se homogeneizan muestras tisulares húmedas ponderadas en 10 volúmenes de metanol que contiene

5,0 mg de patrón interno por ml con un homogeneizador de vidrio y se centrifugan. La fase móvil es una mezcla de acetonitrilo y tampón acetato de sodio 10 mM (pH 4,0; 11:17 (vol/vol)), a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Se determina la concentración de AmB por la razón de la altura de pico de la AmB con respecto a la del patrón interno.

5 **Ejemplo 12.** Focalización de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen camptotecina a células tumorales

Se preparan partículas de administración de agentes bioactivos con un resto de focalización VIP unido al componente polipeptídico de unión a lípidos.

10 El componente polipeptídico de unión a lípidos de las partículas que contienen camptotecina puede ser generado en forma recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*) que ha sido transformada con un vector plasmídico que alberga la secuencia codificante del polipéptido de unión a lípidos. Por ejemplo, se puede emplear ApoA-I humana recombinante. Se cultivan células de *E. coli* que albergan un plásmido de expresión de ApoA-I en medio a 37°C. Cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm alcanza 0,6, se induce la síntesis de ApoA-I por adición de isopropiltiogalactósido (concentración final 0,5 mM). Después de otras 3 horas de cultivo, se obtiene una pella bacteriana por centrifugación y se rompe por sonicación. Se centrifuga el lisado celular a 20.000 x g durante 30 min. a 4°C y se aísla la apoA-I de la fracción del sobrenadante.

20 Se produce una quimera de polipéptido de unión a lípidos recombinante por ingeniería de ApoA-I para incluir una extensión peptídica N-terminal y/o C-terminal que corresponde al neuropéptido de 28 aminoácidos, el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Se pueden emplear quimeras ApoA-I-VIP para crear partículas de administración de agentes bioactivos compuestas por fosfolípido, camptotecina y quimera ApoA-I-VIP.

25 Por ejemplo, se puede construir una quimera ApoA-I-VIP sintetizando cebadores oligonucleotídicos complementarios correspondientes a la secuencia codificante de la secuencia de VIP que posee sitios *Hind* III y *Xba* I terminales. Se hibridan los oligonucleótidos (~100 pares de bases) para generar ADN de doble cadena con los "extremos adherentes" deseados y se subclonan en el vector plasmídico que contiene la secuencia codificante de ApoA-I que tiene sitios de enzimas de restricción *Hind* III y *Xba* I apropiadamente situados. Después de ligar, transformar y cribar para obtener una construcción quimérica positiva, se aísla el ADN plasmídico y se le somete a análisis de secuencia de finalización de cadena didesoxi automatizado. Después de confirmar que la secuencia corresponde a la predicha para la quimera deseada, se realiza la producción de quimera ApoA-I-VIP recombinante en *E. coli*, como se ha descrito anteriormente para la ApoA-I de tipo salvaje. Se evalúa entonces la quimera recombinante purificada por electroforesis en gel, por espectrometría de masas y en cuanto a su capacidad para generar partículas de administración de agentes bioactivos de la invención de un modo similar a la ApoA-I de tipo salvaje, como se describe en el Ejemplo 8.

35 Se pueden usar partículas de administración de agentes bioactivos que contienen quimera ApoA-I-VIP-camptotecina en estudios de inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama para medir el grado de focalización de las partículas lipídicas. Por ejemplo, se obtiene la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 de la American Type Culture Collection y se mantiene a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5% humidificada como cultivos en monocapa en medio de Eagle modificado suplementado con un 10% de suero bovino fetal y los antibióticos penicilina y estreptomycin. Se radioyoda la ApoA-I de tipo salvaje o la quimera ApoA-I-VIP aislada y se incorpora a partículas de administración de agentes bioactivos de la invención que contienen camptotecina y se incuban con las células. Se determina la radiactividad asociada a células tras la incubación de partículas de administración de agentes bioactivos que contienen camptotecina marcadas con células MCF-7 cultivadas a 4°C. Se determina la capacidad de VIP para competir por la unión de la quimera ApoA-I-VIP o de la quimera ApoA-I-VIP asociada a partículas de administración de agentes bioactivos a células MCF en ensayos de unión competitiva. Se evalúan los datos de unión celular por análisis de Scatchard. Se evalúa el grado de internalización en células MCF-7 de partículas de administración de agentes bioactivos de quimera ApoA-I-VIP en incubaciones con partículas de administración de agentes bioactivos que contienen quimera ApoA-I-VIP radioyodada a 37°C. Después de incubar y de lavar, se determina la radiactividad soluble en ácido tricloroacético, obteniendo una medida de la degradación del polipéptido de unión a lípidos.

55 Se valoran los estudios de inhibición del crecimiento y de citotoxicidad con diferentes partículas de administración de agentes bioactivos por ensayo clonogénico. Se resuspenden células en crecimiento exponencial en medio y se determina el número de células usando un contador electrónico. Alternativamente, se puede evaluar la inhibición por partículas de administración de agentes bioactivos de camptotecina-quimera ApoA-I-VIP del crecimiento clonal de MCF-7 en base a la captación reducida de ³⁵S-metionina. Se inoculan alícuotas de células por triplicado en placas de cultivo. Tras la incubación, se añaden partículas lipídicas específicas a partir de una solución stock a las placas para alcanzar concentraciones finales de 0, 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 y 250 nM de camptotecina. Después de intervalos de tiempo específicos que van de 0 a 72 horas, se elimina el medio por aspiración y se añade medio fresco. Se determina el porcentaje de supervivencia a cada concentración de fármaco con diferentes tiempos de exposición a

60

partir de la razón del número de células que excluyen el Azul Tripán y se compara con los resultados obtenidos con partículas control que carecen de camptotecina.

- 5 Aunque la invención que antecede ha sido descrita con algún detalle a modo de ilustración y ejemplos con fines de claridad de comprensión, será aparente para los expertos en la técnica que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones sin desviarse del alcance de la invención. Por lo tanto, la descripción no debe ser considerada como limitante del alcance de la invención, que queda delineada por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula de administración de agentes bioactivos que incluye un polipéptido de unión a lípidos, una bicapa lipídica y un agente bioactivo que tiene al menos una región hidrofóbica, donde el agente bioactivo es un no polipéptido y que no incluye un núcleo acuoso, donde el interior de la bicapa lipídica incluye una región hidrofóbica y el agente bioactivo se incorpora a la región hidrofóbica de la bicapa lipídica, y donde la partícula tiene forma de disco, con una bicapa lipídica discoidal circunscrita por α -hélices anfipáticas y/o láminas β del polipéptido de unión a lípidos, que se asocian con superficies hidrofóbicas de la bicapa alrededor de la periferia de la partícula, y donde dicho polipéptido de unión a lípidos comprende una estructura de α -hélice anfipática de clase A y/o una unidad de lámina β .
- 10 2. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 1, donde la partícula con forma de disco tiene un diámetro de aproximadamente 7 a aproximadamente 29 nm.
- 15 3. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 1 ó 2, donde el agente bioactivo es anfotericina B o camptotecina.
- 20 4. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 1 ó 2, donde el agente bioactivo es seleccionado entre antimicrobianos, agentes anticancerosos, pesticidas, insecticidas, herbicidas, radiomarcajes, compuestos fluorescentes, anestésicos, lípidos bioactivos, agentes antiinflamatorios, nutrientes, lipopolisacáridos y agentes fotosensibilizantes utilizados en terapia fotodinámica.
- 25 5. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 4, donde el antimicrobiano es un antifúngico y/o es nistatina.
- 30 6. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 1 ó 2, donde el agente bioactivo es ácido retinoico todo-trans, alfa-tocoferol o Vitamina E.
- 35 7. La partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polipéptido de unión a lípidos es una apolipoproteína.
- 40 8. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 7, donde la apolipoproteína es seleccionada entre el grupo consistente en ApoA-I, apolipoproteína E (ApoE) y apolipoforina III (ApoIII), apolipoproteína A-IV (ApoA-IV), apolipoproteína A-V (ApoA-V), apolipoproteína C-I (ApoC-I), apolipoproteína C-II (ApoC-II), apolipoproteína C-III (ApoC-III), apolipoproteína D (ApoD), apolipoproteína A-II (ApoA-II), apolipoproteína B-100 (ApoB-100), apolipoproteína J (ApoJ) y apolipoproteína H (ApoH).
- 45 9. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 7, donde la apolipoproteína es una apolipoproteína intercambiable.
- 50 10. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 9, donde la apolipoproteína es apolipoproteína A-I humana.
- 55 11. La partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polipéptido de unión a lípidos es una apolipoproteína quimérica que incluye un resto funcional.
- 60 12. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 11, donde el resto funcional es un resto de focalización hacia el objetivo o tiene actividad biológica.
13. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 7, donde la apolipoproteína ha sido modificada para aumentar la estabilidad de la partícula.
14. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 13, donde la modificación consiste en la introducción de residuos de cisteína para formar enlaces disulfuro intermoleculares o intramoleculares.
15. La partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polipéptido de unión a lípidos es un péptido.
16. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 7, donde la apolipoproteína es apolipoproteína E.
17. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 15, donde el polipéptido de unión a lípidos es el dominio N-terminal de la apolipoproteína E3 o una isoforma de la misma.

18. La partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bicapa lipídica incluye fosfolípidos.
- 5 19. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 18, donde los fosfolípidos comprenden la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y el dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG).
20. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 18, donde los fosfolípidos comprenden la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o la fosfatidilcolina de huevo.
- 10 21. Una composición farmacéutica para administración de un agente bioactivo a un individuo, que contiene una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 15 22. La composición según la reivindicación 21, donde la composición es formulada para liberación controlada.
23. La composición según la reivindicación 21, donde la composición es formulada para administración parenteral, es formulada como un aerosol o es formulada para administración tópica.
- 20 24. La composición según la reivindicación 23, donde dicha administración parenteral es seleccionada entre intravenosa, intramuscular, transdérmica, transmucosal e intratecal.
- 25 25. Un procedimiento para formular una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, cuyo procedimiento consiste en poner en contacto una dispersión acuosa de vesículas lipídicas formadoras de bicapa con un agente bioactivo para formar una mezcla acuosa de vesículas lipídicas formadoras de bicapa-agente bioactivo, y en poner en contacto la mezcla acuosa de vesículas lipídicas formadoras de bicapa-agente bioactivo con un polipéptido de unión a lípidos, donde dicho contacto de la mezcla acuosa de vesículas lipídicas formadoras de bicapa-agente bioactivo con un polipéptido de unión a lípidos consiste en la incubación de las vesículas y del polipéptido de unión a lípidos a, o en proximidad a, la temperatura de transición de fase cristalina de gel a líquido de los lípidos formadores de bicapa presentes en las vesículas lipídicas, para formar así la partícula de administración de agentes bioactivos.
- 30 26. Un procedimiento para formular una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, cuyo procedimiento comprende las etapas de:
- 35 (a) formación de una dispersión acuosa de vesículas lipídicas, donde dichas vesículas lipídicas incluyen lípidos formadores de bicapa;
- (b) adición de un agente bioactivo a la dispersión de vesículas lipídicas para formar una mezcla de vesículas lipídicas-agente bioactivo;
- 40 (c) adición de un polipéptido de unión a lípidos a la mezcla de vesículas lipídicas-agente bioactivo para formar una mezcla de lípidos-agente bioactivo-polipéptido de unión a lípidos; e
- (d) incubación de la mezcla formada en la etapa (c), donde dicha incubación es realizada con las vesículas y el polipéptido de unión a lípidos a, o en proximidad a, la temperatura de transición de fase cristalina de gel a líquido de los lípidos formadores de bicapa presentes en las vesículas lipídicas, para formar así la partícula de administración de agentes bioactivos.
- 45 27. El procedimiento según la reivindicación 26, donde dicha dispersión de vesículas en la etapa (b) proporciona un ambiente adecuado para la transición del agente bioactivo a medio acuoso sin precipitación o separación de fases del agente bioactivo.
- 50 28. El procedimiento según la reivindicación 26, donde dicho procedimiento incluye además la sonicación de la mezcla de la etapa (d).
29. El procedimiento según la reivindicación 25, donde se solubiliza el agente bioactivo en sulfóxido de dimetilo (DMSO) antes de contactar con las vesículas lipídicas formadoras de bicapa.
- 55 30. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, donde se solubiliza el agente bioactivo en DMSO antes de la adición a la dispersión de vesículas lipídicas.
- 60 31. Una partícula de administración de agentes bioactivos preparable según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30.
32. Una composición farmacéutica, que contiene una partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 31 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

33. Una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 ó 31 para uso en el tratamiento de una infección fúngica en un individuo, donde dicho agente bioactivo es un agente antifúngico.
- 5 34. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 33, donde el agente antifúngico es la anfotericina B.
35. Un método de tratamiento de una infección fúngica en una planta, consistente en la administración de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 ó 32 a la planta, donde dicho agente bioactivo es un agente antifúngico.
- 10 36. El método según la reivindicación 35, donde el agente antifúngico es la anfotericina B.
37. Una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 ó 31 para uso en el tratamiento de un tumor en un individuo, donde dicho agente bioactivo es un agente antitumoral.
- 15 38. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 37 formulada para administración tópica.
- 20 39. La partícula de administración de agentes bioactivos según la reivindicación 37 ó 38, donde el agente antitumoral es la camptotecina.
40. La partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, donde el polipéptido de unión a lípidos comprende el péptido intestinal vasoactivo y el tumor es un tumor de mama.
- 25 41. Una composición para administración de un agente bioactivo a un individuo, que contiene una partícula de administración de agentes bioactivos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 ó 31 y un soporte.
- 30 42. La composición de la reivindicación 41, donde el individuo es una planta.

FIGURA 1

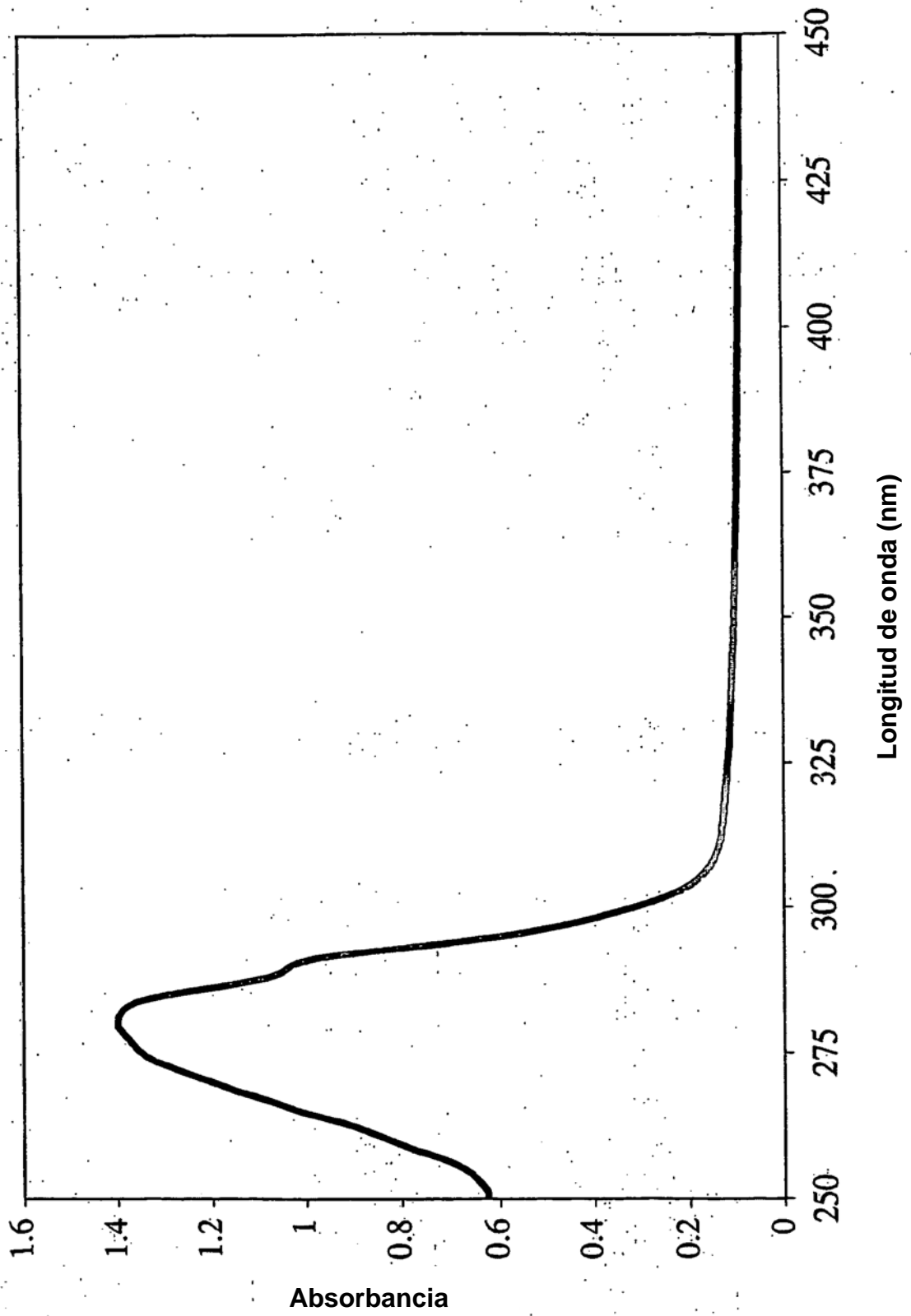


FIGURA 2

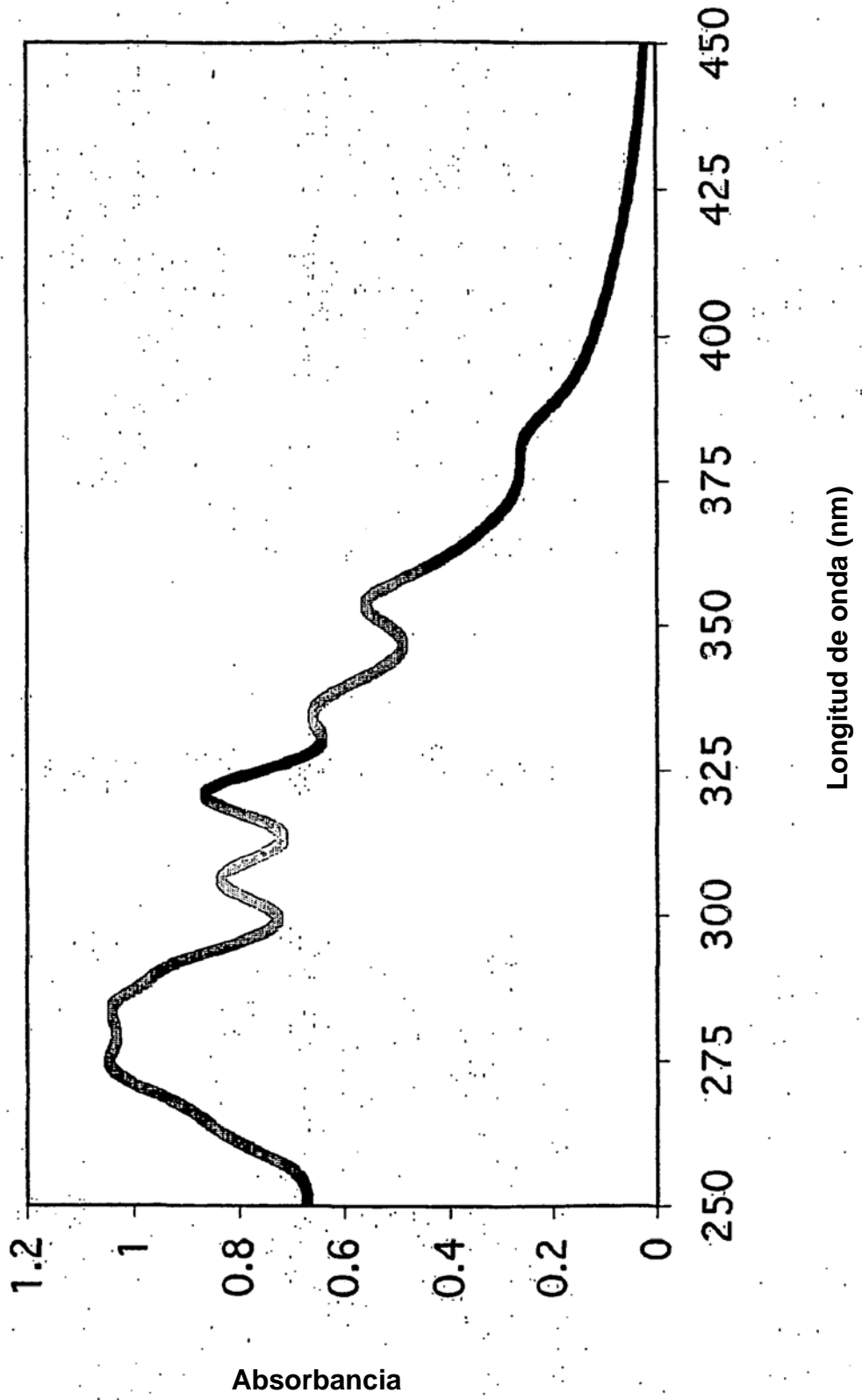


FIGURA 3

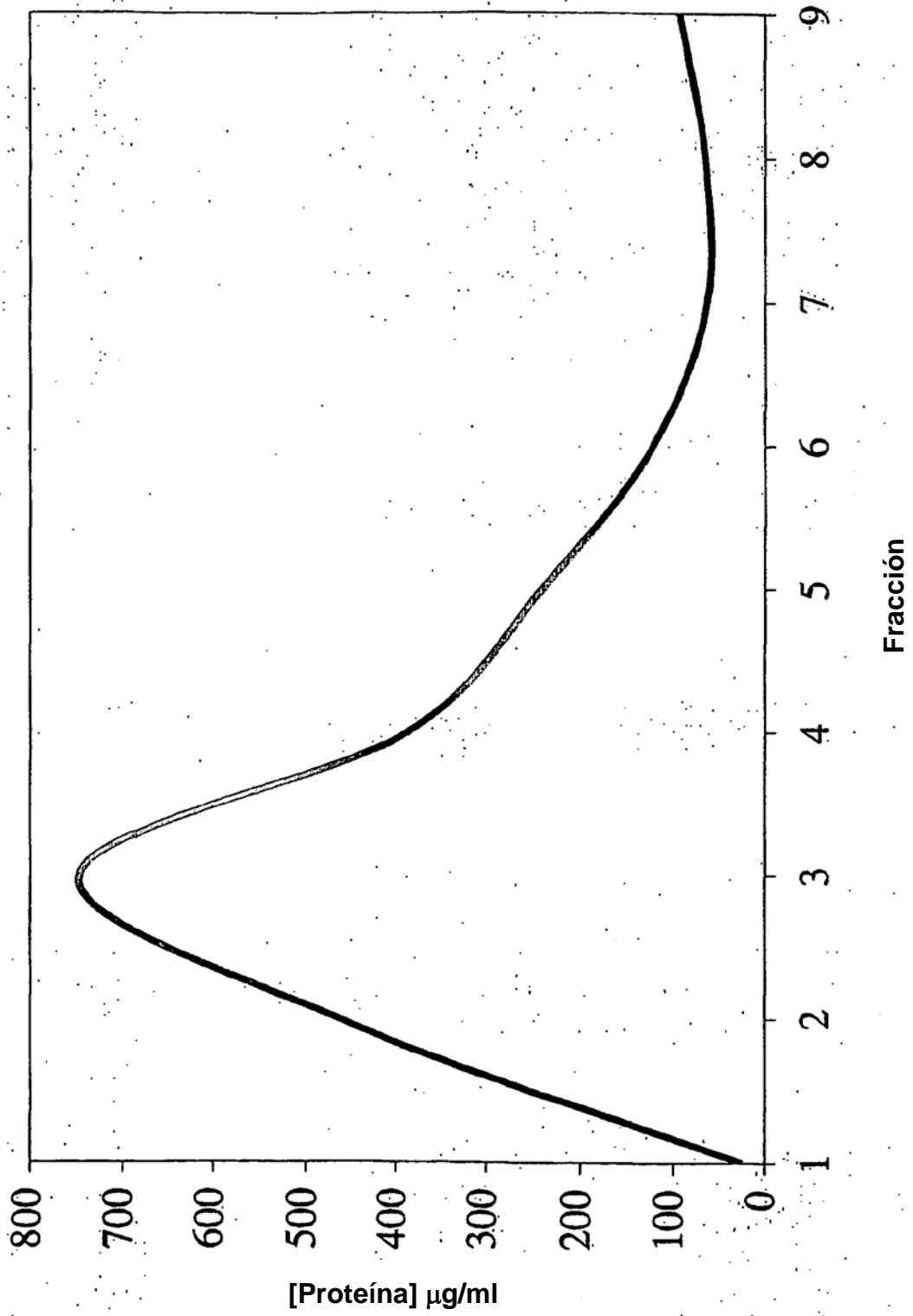


FIGURA 4

**Diámetro de
Stokes (nm)**

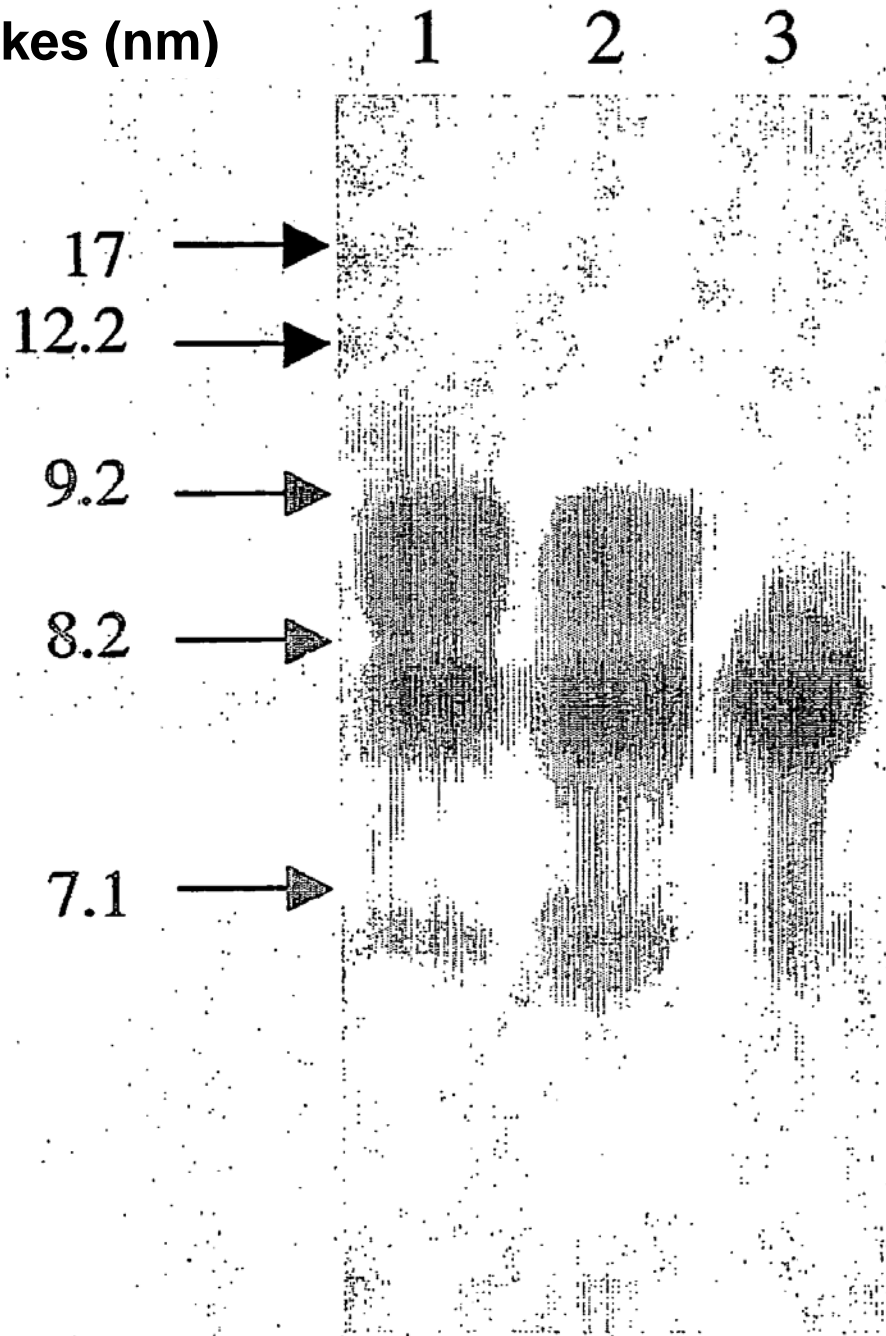


FIGURA 5

**Diámetro de
Stokes (nm)**

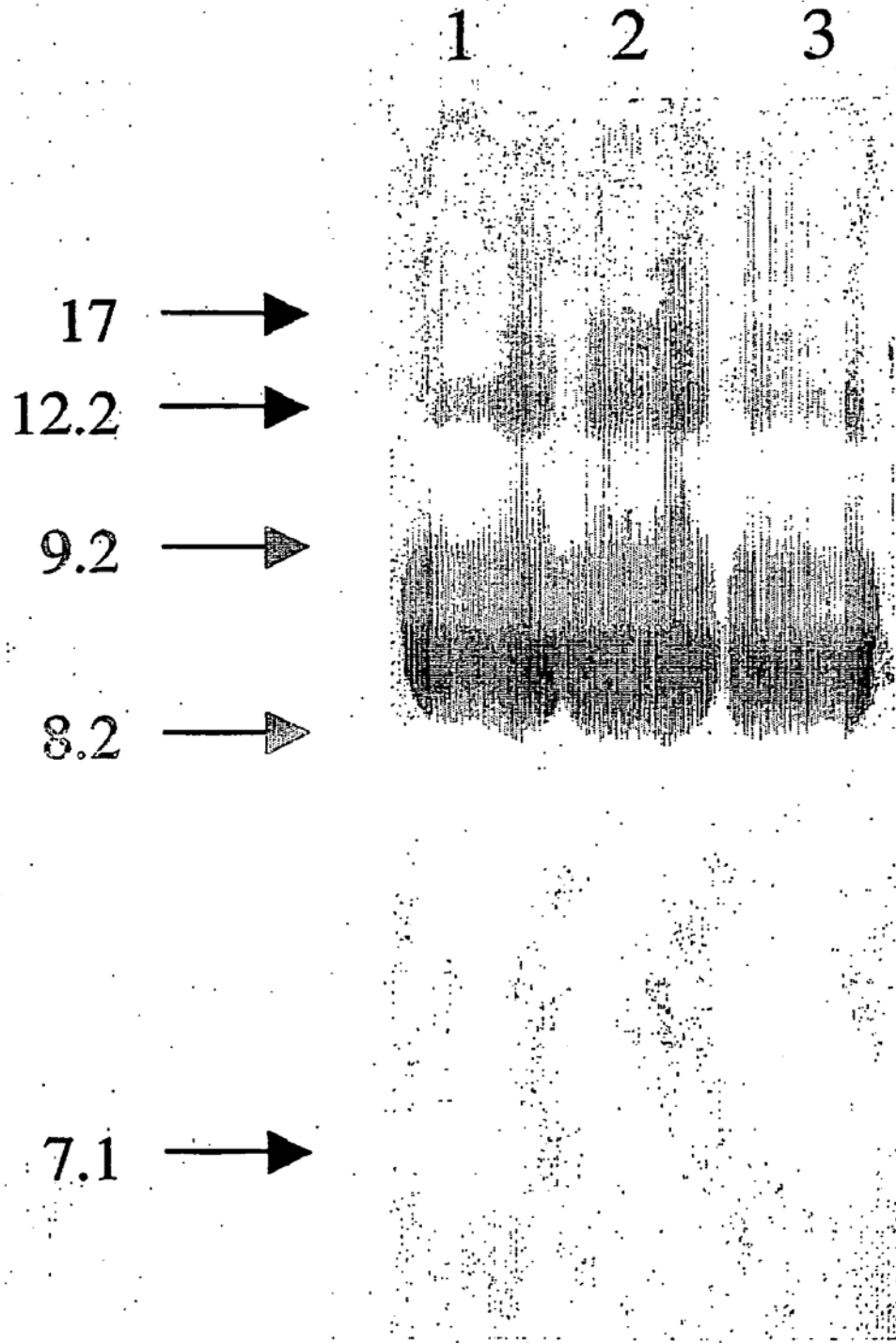


Figura 6A

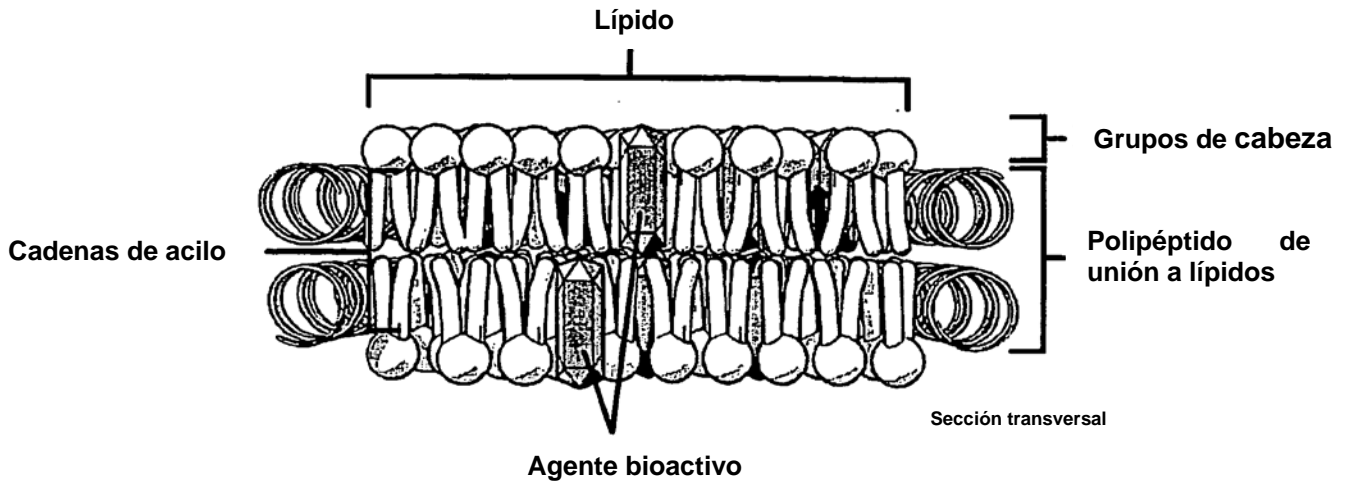


Figura 6B

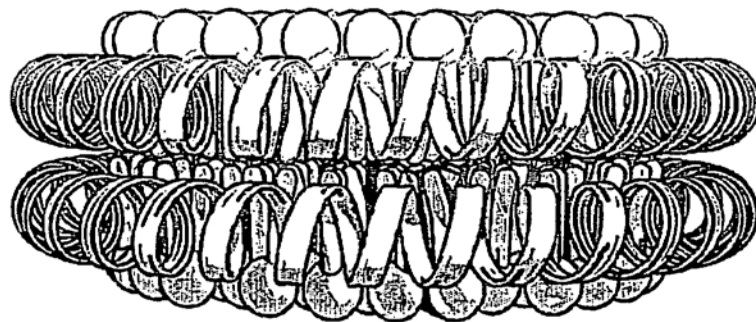


Figura 7A

Focalización: Factor de apareamiento α

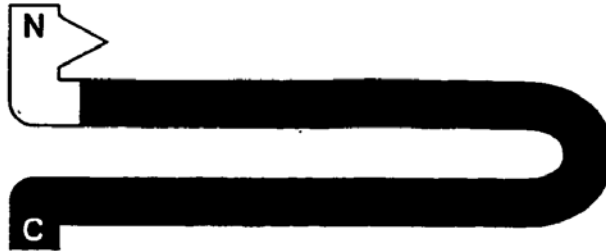


Figura 7B

Efactor sinérgico: Histatina-5

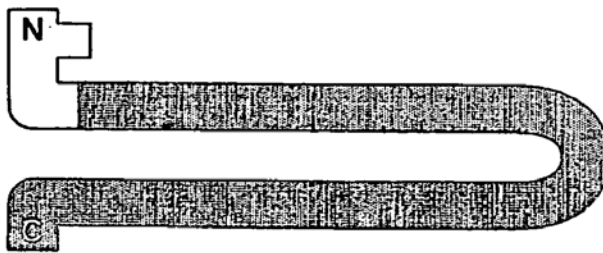


Figura 7C

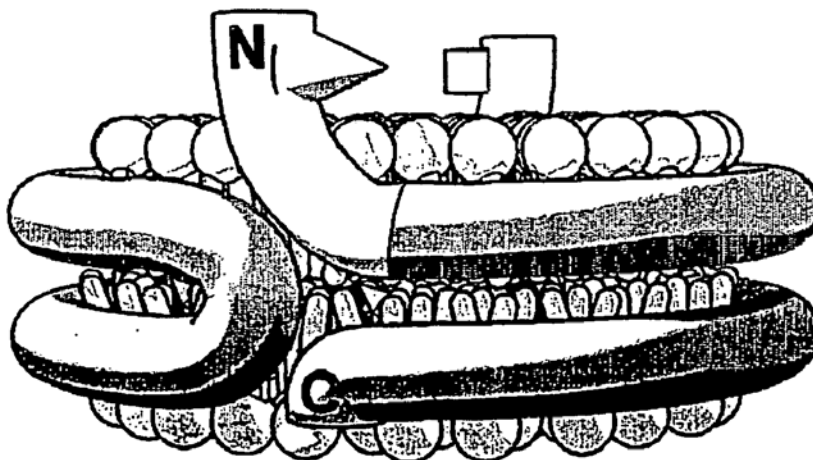


FIGURA 8
Respuesta a AmB

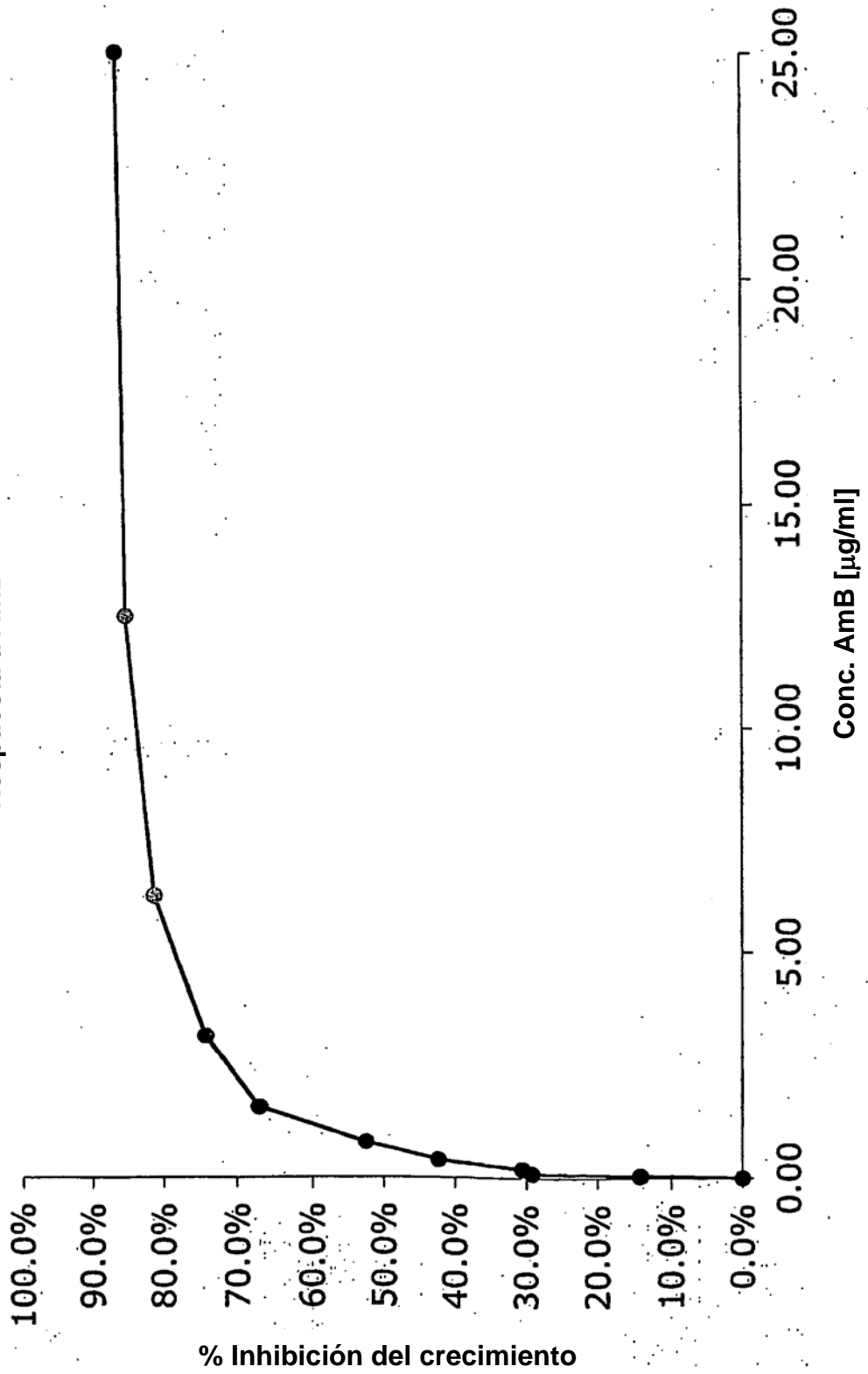


FIGURA 9

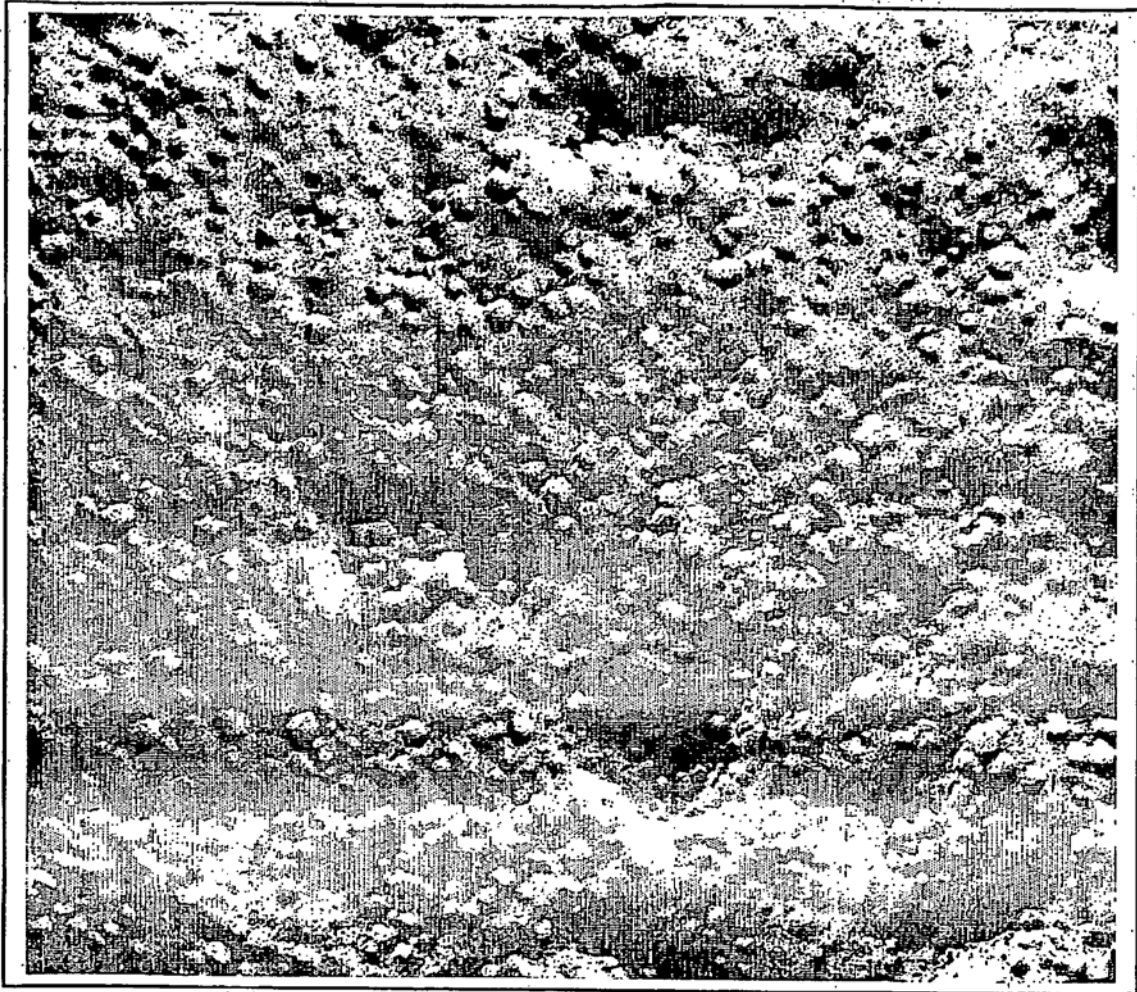


FIGURA 10

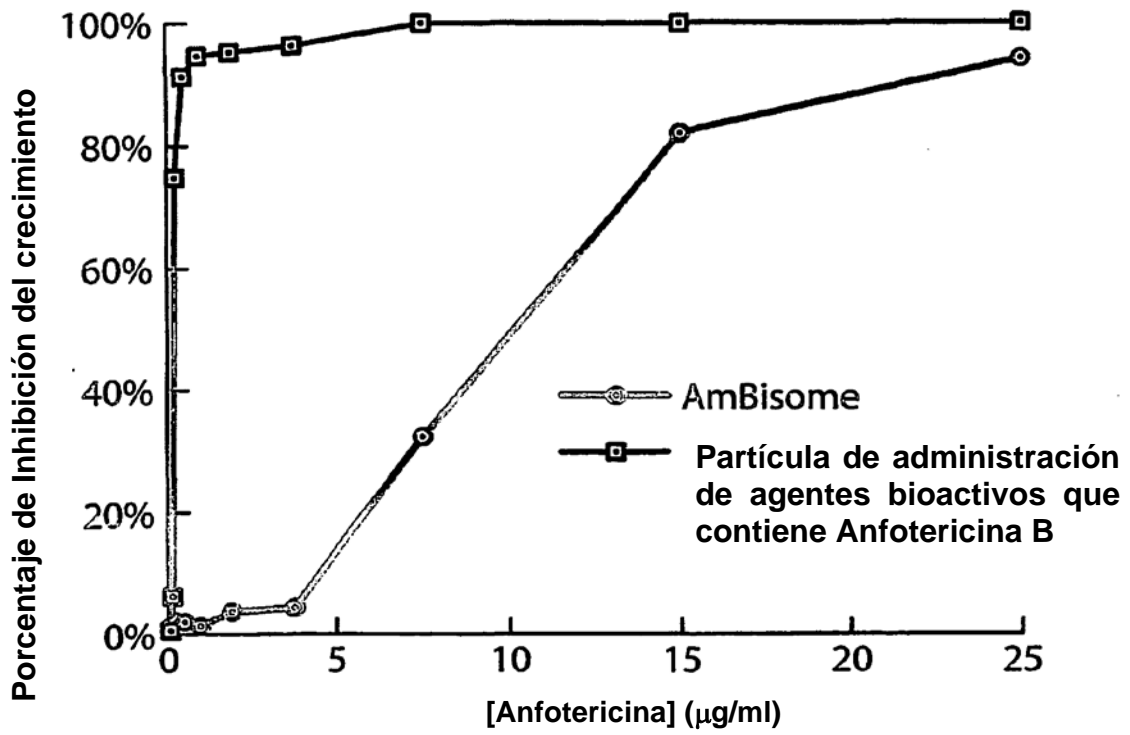


FIGURA 11

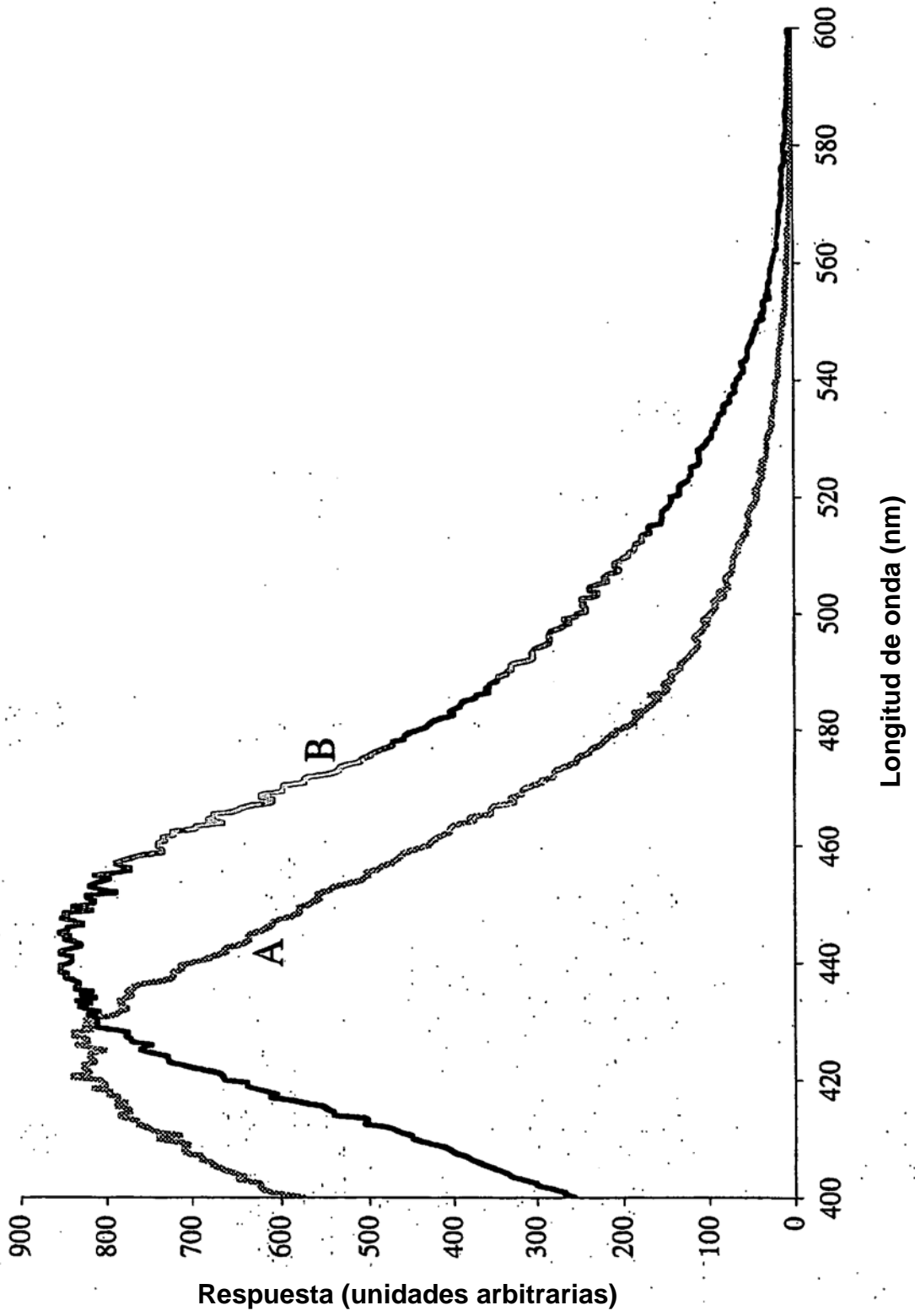


FIGURA 12

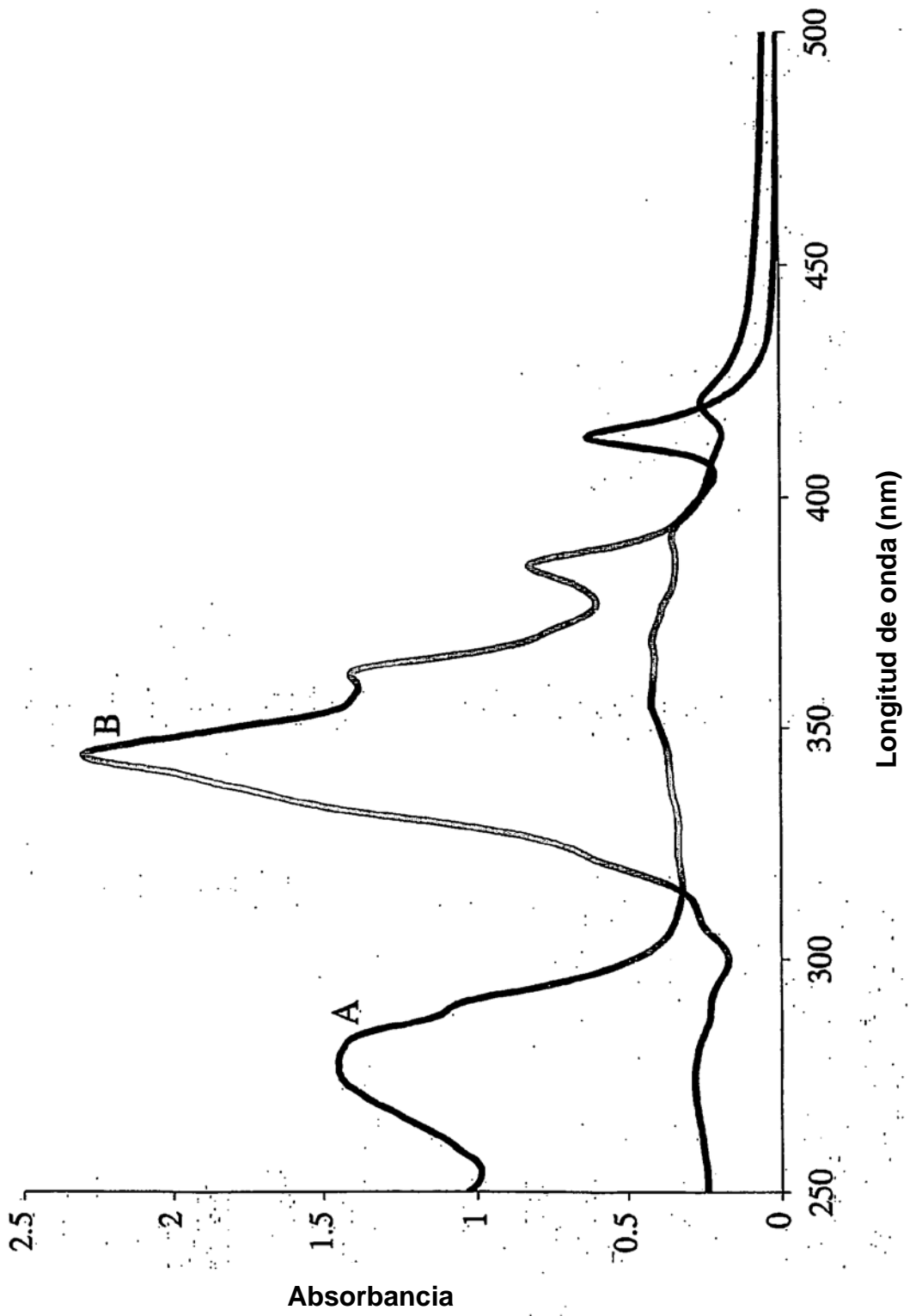


FIGURA 13

