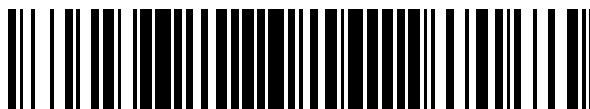


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 147**

21 Número de solicitud: 201130185

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **11.02.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.11.2012

71 Solicitante/s:

**FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD (33.3%)
AVENIDA AMÉRICO VESPUCIO, 5 - BLQ 2, 2ª PL
41092 SEVILLA, ES;
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%) y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**POZO PÉREZ, David ;
KLIPPSTEIN MARTIN, Rebecca ;
GONZÁLEZ CAMPORA, Ricardo ;
TRIGO SÁNCHEZ, Inmaculada y
VARGAS DE LOS MONTEROS, María Teresa**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **NANOLIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON PÉPTIDOS BIOACTIVOS COMO SISTEMAS PARA MEJORAR LA CITOTOXICIDAD DE FÁRMACOS ANTITUMORALES.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con nanoliposomas funcionalizados con péptidos bioactivos en su superficie que permiten la identificación de tejidos y/o células diana y la liberación de fármacos de forma selectiva, y en particular, con nanoliposomas funcionalizados con el péptido VIP que incorporan un principio activo, de forma preferente doxorubicina. Asimismo, se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos nanoliposomas, a un procedimiento de preparación de los mismos así como a sus usos médicos.

ES 2 390 147 A1

DESCRIPCIÓN
NANOLIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON PEPTIDOS BIOACTIVOS
COMO SISTEMAS PARA MEJORAR LA CITOTOXICIDAD DE FÁRMACOS
ANTITUMORALES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, de la química, la bioquímica y la inmunología, y se refiere al uso de nanoliposomas funcionalizados con péptidos en su superficie que permiten la identificación de tejidos y/o células diana y la liberación de fármacos de forma selectiva, y en particular, a la funcionalización de nanoliposomas con el péptido VIP. La presente invención también se refiere a las composiciones, al procedimiento de preparación y a los usos de dichos nanoliposomas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Existe un creciente interés por los efectos biológicos de las nanopartículas, de su toxicidad y su alcance en función del medio (M. Tsoli *et al.* 2005. *Small* (2005); 1:841), por ejemplo, su uso potencial como herramienta terapéutica en tratamientos de cáncer (El-Sayed *et al.*, 2005. *Nano Letters* Vol.5, 5. 829-834).

Gracias al enorme interés de esos nano-bioconjugados se han desarrollado un amplio rango de aplicaciones tales como distribución de fármacos, marcadores moleculares, análisis bioquímicos ultrasensibles, desarrollo de dispositivos "lab-on-a-chip", construcción de nanocomponentes electrónicos, motores nano-moleculares...etc [C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin Eds. *Nanobiotechnology*, Wiley-VCH 2004].

Entre los diferentes tipos de nanopartículas, los nanoliposomas son de especial relevancia debido a que son los sistemas nanométricos mejor establecidos clínicamente para el transporte y envío de fármacos gracias a que no son citotóxicos, son biocompatibles y biodegradables, y además su síntesis es relativamente barata y de fácil escalado en procesos industriales. Los liposomas en general se han utilizado en terapias para el tratamiento de cáncer durante más de una década ya que han demostrado reducir de forma sistémica los efectos secundarios, la toxicidad y facilitando la eliminación del fármaco.(Torchlin, 2005. *Nat Rev. Drug Discovery* 4, 145).

Los nanoliposomas se pueden utilizar como transportadores de diversas sustancias tanto en su exterior como en su interior y para una variedad de aplicaciones

biomédicas como terapia génica o para el envío de fármacos, de forma que los ácidos nucleicos o el fármaco vayan protegidos en su interior evitando su degradación enzimática y su contacto directo con otras células sanas. Por otra parte permiten el envío de moléculas biológicamente activas de carácter lipófilo y tamaños superiores a los 500 Da, dos de los problemas más importantes que puede presentar una molécula activa para terminar como principio activo de un medicamento.

Los nanoliposomas de diversos tamaños, normalmente menores de 400 nm pueden entrar de forma rápida en las zonas en las que existen tumores ya que la pared del endotelio vascular se encuentra fenestrada. Por el contrario, los nanoliposomas permanecen en el torrente sanguíneo del tejido sano mediante la pared del endotelio vascular no fenestrado.

Una de las limitaciones para el uso clínico de los péptidos en general, fundamentalmente de los neuropéptido, y del péptido VIP en particular, es su corta vida media en circulación, lo que haría necesaria la administración crónica del mismo, aumentando los costes económicos y dificultando su posología al paciente. La unión de péptidos a los liposomas aumenta la vida media de las moléculas unidas a los mismos, ya que dificulta su ataque proteolítico.

Además, la funcionalización de los nanoliposomas con péptidos que reconocieran con mayor selectividad las dianas terapéuticas, permitiría el direccionamiento de forma específica en aquellos casos en los que se conoce que dichas dianas sobreexpresan los receptores que reconocen dichos péptidos.

Actualmente existen liposomas funcionalizados con péptidos en su superficie. Por ejemplo, los liposomas funcionalizados con tuftsin han permitido aumentar la eficacia de estibogluconato sódico (Agrawal & Gupta, 2000. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41: 135-146; Gupta & Haq, 2005. *Methods Enzymol.* 391: 291-304) y anfotericina B (Gupta & Haq, 2005. *Methods Enzymol.* 391: 291-304, Agrawal *et al.*, 2002. *J. Drug Target.* 10: 41-45).

Hasta el momento, se han desarrollado dos formas de preparar liposomas funcionalizados con péptidos, en los que los ligandos del péptido se unen al extremo terminal de una cadena de PEG. El primer método supone incorporar conjugados lípido-PEG con su extremo funcionalizado en los liposomas y a continuación conjugarlo con los ligandos peptídicos (Zalipsky *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 1995, 6, 705-8). Sin embargo, cuando el grupo terminal del PEG funcionalizado se conjuga con los

ligandos del péptido, se puede producir una conjugación no homogénea si hay más de un grupo reactivo en el ligando.

El segundo método es incorporar directamente el conjugado péptido-PEG-lípido en las membranas liposomales (Zalipsky et al., *Bioconjug. Chem.*, 1997, 8, 111-8). No obstante, la síntesis de estos conjugados es difícil, dado que las propiedades químicas de las cadenas laterales en los péptidos son diversas, la masa molecular del PEG es heterogénea y la naturaleza de los lípidos es anfifílica. Estas propiedades dificultan la protección de las cadenas laterales en el procedimiento de síntesis, la purificación, y la reacción. De hecho, muy pocos conjugados péptido-PEG-lípido han sido sintetizados. La solicitud US2007/0106064 describe la preparación de este tipo de conjugados mediante el empleo de una resina peptídica en la que los grupos amino son inicialmente protegidos.

Por otro lado, los efectos biológicos del neuropéptido VIP tienen un interés creciente por su capacidad moduladora en patologías en las que hay un componente inflamatorio y/o autoinmunitario [Grimm, M. C. et al. (2003) *J. Immunol.* 171, 4990–4994; Pozo, D. (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 211–217; Ganea, D., and Delgado, M. (2002). *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 229–237; Delgado, M. et al. (2003). *Trends Immunol.* 24, 221–224; Pozo et al. (2009). *J Immunol* 183, 4346-4359].

En el caso concreto del péptido VIP, el proceso de funcionalización de nanoliposomas con este péptido se enfrenta al problema añadido de diseñar un procedimiento en el que quede el extremo carboxilo terminal de VIP libre, ya que es por este extremo por el que interacciona con sus receptores específicos de membrana. Es necesario, por tanto, desarrollar un procedimiento de funcionalización de nanoliposomas con péptidos, dejando el extremo carboxilo terminal de dicho péptido libre para interaccionar con su receptor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado nanoliposomas funcionalizados con péptidos en su superficie, estables, no tóxicos, solubles en agua, y compatibles con los sistemas biológicos, así como un procedimiento para su obtención, que son útiles para vehicular principios activos y/o composiciones farmacéuticas. El procedimiento que conduce a estos nanoliposomas permite la funcionalización con el péptido de manera que queda libre el extremo carboxilo-terminal, dejando así intacta

su capacidad de interacción con sus receptores específicos, lo que permite formular estrategias de detección y liberación selectivo *in vivo* de fármacos sobre células que
5 abordar. interese eliminar (como es el caso de las células tumorales), o bien expandir (mediante la administración de factores tróficos) en función de la patología que se pretenda

En particular, se ha demostrado que mediante la funcionalización del péptido VIP en la superficie del nanoliposoma, se maximiza su entrada en las zonas con tumores debido al endotelio vascular fenestrado, a la vez que se permite su direccionamiento de forma específica en aquellos casos en los que las células cancerosas sobreexpresan los
10 receptores de la familia de VIP del tipo siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, como es el caso del cáncer de próstata. Además de permitir que VIP actúe como agente terapéutico sobre células diana o como modo de liberación de fármacos sobre células que sobreexpresan receptores VIP, aumenta la vida media de la molécula unida a la misma, ya que dificulta el ataque proteolítico.

Además, se ha demostrado que la funcionalización de los nanoliposomas con el péptido VIP aumenta la capacidad citotóxica de fármacos antitumorales encapsulados en el interior del nanoliposoma, tales como la doxorrubicina, mejorando la efectividad de este principio activo, lo que posibilita la incorporación del fármaco en la composición liposomal a concentraciones más bajas que las empleadas en otras
20 formulaciones del estado de la técnica, como el caso de los liposomas no funcionalizados o en solución.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un nanoliposoma funcionalizado en su superficie con un péptido, de ahora en adelante nanoliposoma de la invención, que comprende:

- 25
- un conjugado lípido-espaciador-maleimida; y
 - un péptido modificado con un grupo sulfhidrilo;

de manera que el péptido se encuentra unido covalentemente al nanoliposoma a través de la reacción entre la maleimida del conjugado y el grupo sulfhidrilo del péptido modificado.

30 En una realización particular, el nanoliposoma comprende además un principio activo. Dicho principio activo puede ser hidrofílico, quedando incorporado en el núcleo acuoso del nanoliposoma, o bien puede ser hidrofóbico, en cuyo caso queda incorporado en la bicapa lipídica del nanoliposoma.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de un nanoliposoma conjugado como se ha definido previamente, que comprende:

- 5 a) formar un film de lípidos que comprende un conjugado lípido-espaciador-maelimida como se ha definido previamente;
 - b) rehidratar el film con una solución tampón a un pH esencialmente neutro y añadir un solvente orgánico para formar un sistema de dos fases;
 - c) someter el sistema de dos fases a sonicación para formar liposomas dispersos en una sola fase;
 - 10 d) eliminar el solvente orgánico hasta obtener una fase gel;
 - e) convertir el gel en una suspensión acuosa donde quedan los liposomas;
 - f) someter la suspensión acuosa a sonicación para convertir los liposomas en nanoliposomas;
 - g) añadir el péptido modificado a la suspensión de los nanoliposomas.
- 15 Un tercer aspecto de la invención lo constituye un nanoliposoma funcionalizado obtenible según el procedimiento descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un nanoliposoma tal como se ha definido previamente y un principio activo capaz de diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad.

- 20 Un último aspecto de la invención se refiere al uso del nanoliposoma tal como se ha definido previamente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 Figura 1: Estructura del neuropéptido péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Figura 2: Determinación de péptido VIP en la superficie del nanoliposoma cargado con una sustancia biológicamente relevante, en este caso doxorubicina.

Figura 3: Caracterización del tamaño de los naoliposomas mediante Dynamic Light Scattering (DLS).

30

Figura 4: Caracterización funcional de la interacción con receptores VPAC (producción de AMPc, segundo mensajero intracelular del sistema receptor/efector de VIP) sobre líneas tumorales de cáncer de próstata.

- Figura 5: Microscopía óptica (20X) tras 48 horas de tratamiento de células DU-145. (A) células sin tratar; (C) y (E) muestran las células tras ser tratadas con nanoliposomas y nanoliposomas funcionalizados con VIP respectivamente. En (B), (D) y (F) se muestran las células tratadas con doxorubicina soluble, doxorubicina encapsulada en el nanoliposoma, y doxorubicina encapsulada en el nanoliposoma funcionalizado con VIP.
- 10 Figura 6: Histograma que representa el porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en la línea celular DU-145 tras la exposición al fármaco doxorubicina (10 µg/mL) durante 24 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 En el contexto de la presente invención, se entiende por nanoliposomas los compartimentos acuosos esencialmente esféricos, rodeados de al menos una doble capa lipídica cerrada, que tienen un diámetro medio menor de 1000 nm, preferiblemente menor de 400 nm.

- 20 Por "diámetro medio" se entiende el diámetro promedio de la población de nanoliposomas dispersa en un medio acuoso. El diámetro medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental más abajo.

De forma preferente, los nanoliposomas tienen un diámetro medio de entre 75 y 125 nm, preferiblemente entre 85 y 115 nm, más preferiblemente entre 95-105 nm.

- 25 Los nanoliposomas de la invención comprenden un conjugado lípido-espaciador-maleimida. En el contexto de la invención, por conjugado debe entenderse el producto resultante de la unión covalente entre los tres componentes constituyentes del conjugado, es decir, el lípido, el espaciador y la maleimida.

- 30 *Lípido*

El término "lípido", tal como aquí se utiliza, es una molécula anfifática natural o sintética que posee una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica en la misma molécula

y que puede formar espontáneamente vesículas bicapa en un medio acuoso o puede ser incorporada de forma estable en bicapas lípidas.

El término lípido comprende acilglicéridos, céridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos y glucolípidos (cerebrósidos y gangliósidos). Ejemplos de estos lípidos incluyen
5 estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, acetilpalmitato, ricinolato de glicerol, miristato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímero acrílico anfotérico, amidas de ácidos grasos, colesterol, éster de colesterol, diacilglicerolsuccinato, diacil glicerol, ácido graso y similares.

Asimismo, pueden emplearse lípidos catiónicos que consisten en un grupo terminal
10 cargado positivamente, tal como una amina, poliamina o polilisina, unido a una porción lipofílica de carácter neutro, tal como un esteroles, una cadena hidrocarbonada o dos cadenas hidrocarbonadas. Ejemplos de estos lípidos catiónicos incluyen 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino)propano (DOTAP); bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DORIE),
15 cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetilamonio (DDAB).

En una realización preferente, el término lípido se refiere a un fosfolípido. El término "fosfolípido" comprende a los fosfoacilgliceroles, es decir, compuestos que se componen de una molécula de glicerol, dos de cuyos grupos hidroxilos se encuentran
20 esterificados por ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos de cadena lineal saturada o parcialmente insaturada con 8 a 28 átomos de carbono), estando el tercero grupo hidroxilo esterificado por un grupo fosfato que une mediante un enlace fosfodiéster el glicerol a otra molécula orgánica que, por lo general, contiene nitrógeno, como colina, serina o etanolamina y que puede poseer una carga eléctrica. Ejemplos de
25 fosfoacilgliceroles son la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol, el ácido fosfatídico, la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina. También se encuentran comprendidos dentro del término fosfolípidos aquellas mezclas complejas extraídas de productos naturales que comprenden esencialmente fosfoacilgliceroles tales como la lecitina.

En una realización preferente de la presente invención, el fosfolípido se selecciona
30 entre 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) y combinaciones de los mismos.

Espaciador

Como espaciador se puede utilizar un polímero hidrofílico lineal con grupos terminales funcionales capaces de unirse al lípido y al grupo amino de la maleimida. Espaciadores adecuados en la presente invención incluyen, aunque no se limitan a, 5 poliglicina, polietilenglicol, polipropilenglicol, polimetilacrilamida, polidimetacrilamida, polihidroxietilacrilato, polihidroxiopropilmetacrilato y polioxialqueno. De forma preferente, el espaciador es polietilenglicol (PEG).

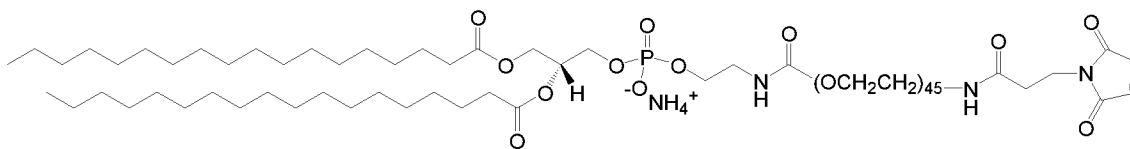
La conjugación del lípido con el PEG requiere que tanto el PEG como el lípido tengan un grupo terminal funcional adecuado. Cuando la unión resultante entre ambos 10 componentes es un grupo amino (lípido-NH-PEG) el PEG puede funcionalizarse con un haluro o un sulfonato de manera que se acopla con un grupo amino terminal del lípido. Cuando la unión resultante entre ambos componentes es un grupo uretano (lípido-NHC(O)O-PEG) el PEG puede funcionalizarse mediante un carbonato activado (-C(O)-imidazolil, -OC(O)-para-nitrofenil, -OC(O)-succinimida, -OC(O)-2,4,4- 15 triclorofenil) de manera que se acopla con un grupo amino terminal del lípido. Cuando la unión resultante entre ambos componentes es un grupo amido (lípido-NHC(O)-PEG) el PEG puede funcionalizarse mediante un grupo carboxilo activado (grupo carboxilo activado mediante DCC (diclorohexilcarbodiimida)/HOBt (N-hidroxibenzotriazol), DCC/DMAP (dimetlaminopiridina), DIPCDI (1,3-diisopropilcarbodiimida)/HOBt, EDC (1- 20 (3-dimetilaminopropil)-3-etil-carbodiimida))/NHS (N-hidroxisuccinimida)) de manera que se acopla con un grupo amino terminal del lípido.

En una realización preferente, la unión del fosfolípido con el PEG se lleva a cabo a través de un enlace amida, resultante de la reacción entre el grupo carboxilo con el que se funcionaliza el PEG y el grupo amino terminal de la molécula orgánica del 25 fosfolípido.

Por su parte, la conjugación del PEG con la molécula de maleimida requiere también que el PEG tenga en el otro extremo un grupo terminal funcional adecuado capaz de reaccionar con el grupo amino de la maleimida. Para ello, se pueden utilizar cualquiera de los grupos funcionales anteriormente mencionados.

30 En una realización preferente, el conjugado lípido-espaciador-maleimida tiene la siguiente estructura:

9



que corresponde con 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-maleimida] o (DSPE-PEG-maleimida).

Dicho conjugado se encuentra disponible comercialmente.

5 *Péptido*

Según la presente invención, el péptido es un péptido sintético o natural compuesto por una cadena de aminoácidos. En una realización particular, el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en hormonas, citoquinas, toxinas, quemotaxinas y péptidos de la matriz extracelular para la adhesión celular.

10 Dicho péptido se puede unir a un receptor tal como receptores de somatostatina, receptores de péptido intestinal vasoactivo, receptores de integrina o receptores de factores de crecimiento, entre otros.

En una forma de realización preferida, el péptido se selecciona de una lista que comprende: glucagon, polipéptido inhibitorio gástrico (GIP), secretina, hormona de crecimiento, somatoliberina, somatotropina, péptido PHI (peptide histidine isoleucine),
 15 péptido PHM (peptide histidine-methionine), PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptides), adrenomedulina, corticostatina y péptido intestinal vasoactivo (VIP). De forma preferente, el péptido es un neuropéptido, y más preferiblemente es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) cuya estructura se encuentra representada en la
 20 Figura 1.

En el contexto de la presente invención, se entiende por neuropéptido a una molécula constituida por dos o más aminoácidos originados por transducción sináptica cerebral. Su dimensión puede variar desde dos aminoácidos, como la carnosina, hasta más de cuarenta como la CRH (hormona liberadora de corticotropina). Tienen función cerebral
 25 tanto estimulante como inhibitoria, produciendo efectos como analgesia, apetito o sueño, entre otros.

En esta memoria, se entiende como péptido intestinal vasoactivo (VIP por sus siglas en inglés vasoactive intestinal peptide) una hormona polipeptídica formada por 28

residuos de aminoácidos y producida por muchas estructuras del cuerpo humano como el aparato digestivo, el páncreas y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo en el cerebro. Se caracteriza por su propiedad vasodilatadora y su actividad en el sistema nervioso periférico (por ejemplo, el VIP relaja los pulmones, la tráquea y la musculatura gástrica). Inhibe la secreción de enzimas gástricas y estimula la secreción de glucagón, insulina y somatostatina, aumenta la adenilciclase, así como la secreción biliar en el hígado.

El VIP también se denomina como PHM27 ó MGC13587. Está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 6 (6q25). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 1.

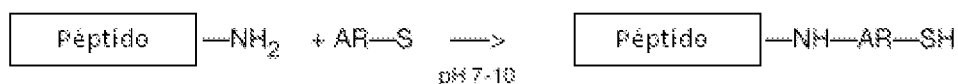
En el contexto de la presente invención, VIP se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales el péptido VIP.

Se conocen tres receptores de VIP denominados VPAC1, VPAC2 y PAC1. El receptor VPAC1 se expresa en neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como son los de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria, mientras que VPAC2 solo se ha encontrado en unos pocos tumores. PAC1, por el contrario, se expresa fundamentalmente en tumores originados en los sistemas neuronales y endocrinos, como pueden ser por ejemplo los tumores gliales (glioblastomas, neuroblastomas, astrocinomas, etc.), o adenomas pituitarios.

Con el fin de funcionalizar el nanoliposoma con el péptido, éste se modifica incorporando un grupo sulfhidrilo terminal mediante métodos conocidos en el estado

de la técnica. Por ejemplo, el péptido se hace reaccionar con el reactivo de Traut (hidrocloruro de 2-iminotiolano) según el siguiente esquema:

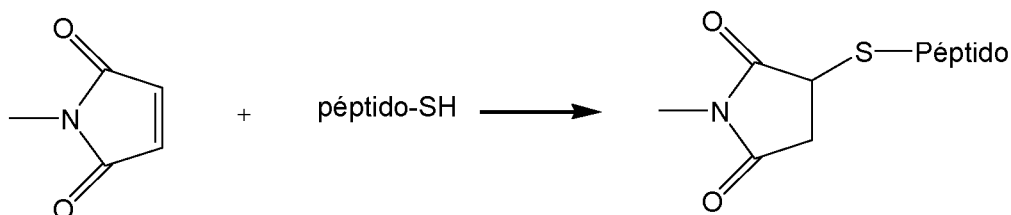


5 donde AR-S es el reactivo de Traut.

La adición de EDTA a la reacción ayuda a prevenir la oxidación del grupo sulfhidrilo evitando la formación de enlaces disulfuro.

El péptido se une al nanoliposoma por reacción del grupo sulfhidrilo con la molécula de maleimida del conjugado presente en el nanoliposoma y descrito con anterioridad,

10 según el siguiente esquema:



En una realización particular, el péptido se modifica con una molécula de cisteína, de manera que queda también el grupo -SH libre para poder reaccionar con la maleimida del conjugado.

15

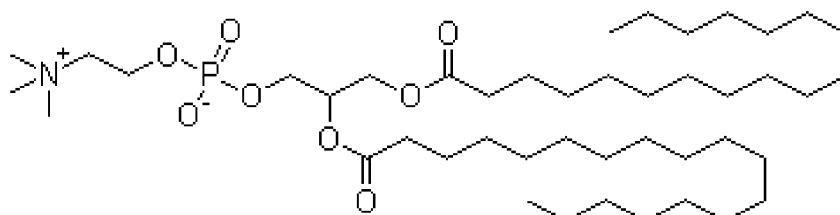
Los nanoliposomas pueden comprender además otros fosfolípidos que no se encuentran conjugados sino libres, tales como los que se han mencionado anteriormente. En una realización particular, estos fosfolípidos se seleccionan entre

20

1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) y combinaciones de los mismos. De forma preferente, estos fosfolípidos son 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC) representado en la fórmula (I), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC)

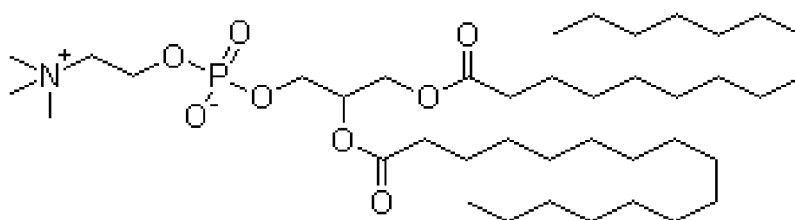
25

representado en la fórmula (II) o cualquiera de sus sales, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones de los compuestos de fórmula (I) y (II).



(I)

5



(II)

Estos fosfolípidos también pueden encontrarse conjugados con una molécula de PEG.

10 En una realización preferente, los nanoliposomas comprenden 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG).

Preferentemente, los nanoliposomas de la invención comprenden, además del conjugado lípido-espaciador-maleimida y del péptido modificado, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC).

15 De forma aún más preferente, los nanoliposomas de la invención comprenden:

- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-maleimida] o (DSPE-PEG-maleimida);
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG);
- 20 - 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC),
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), y
- un péptido modificado con un grupo sulfhidrilo;

de manera que el péptido se encuentra unido covalentemente al nanoliposoma a través de la reacción entre la maleimida del conjugado y el grupo sulfhidrilo

25

del péptido modificado.

De forma preferente, el péptido es el péptido VIP modificado con una molécula de cisteína.

Preferentemente, el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4. De forma preferente, el DSPE-PEG y el conjugado DSPE-PEG-Maleimida se encuentran a una concentración final de en torno al 5 y 10%, respectivamente.

La bicapa lipídica de los nanoliposomas puede contener además uno o más esteroides tales como colesterol, lanosterol, dihidrolanosterol, desmosterol, dihidrocolesterol, fitosterol, estigmasterol, sitosterol, campesterol y brasicasterol, azúcares tales como glicerol y sacarosa, ésteres de ácidos grasos de glicerina tales como trioleína y trioctanoína.

Asimismo, puede contener sustancias antioxidantes tales como tocoferol, propil galato, palmitato de ascorbilo e hidroxitolueno butilado, compuestos que proporcionan carga positiva tales como estearilamina y oleilamina, compuestos que proporcionan carga negativa tales como dicetilfosfato, proteínas de membrana.

Procedimiento de obtención de los nanoliposomas

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la preparación de los nanoliposomas definidos anteriormente, que comprende:

- a) formar un film de lípidos que comprende un conjugado lípido-espaciador-maleimida como se ha definido previamente;
- b) rehidratar el film con una solución tampón a un pH esencialmente neutro y añadir un solvente orgánico para formar un sistema de dos fases;
- c) someter el sistema de dos fases a sonicación para formar liposomas dispersos en una sola fase;
- d) eliminar el solvente orgánico hasta obtener una fase gel;
- e) convertir el gel en una suspensión acuosa donde quedan los liposomas;
- f) someter la suspensión acuosa a sonicación para convertir los liposomas en nanoliposomas;
- g) añadir el péptido modificado a la suspensión de los nanoliposomas.

En una realización preferente, el conjugado lípido-espaciador-maleimida se encuentra en una proporción de en torno a un 10% en peso con respecto al peso total del film de lípidos.

- 5 En una forma preferente, el film de lípidos comprende además al menos un fosfolípido y/o al menos un fosfolípido conjugado con una molécula de PEG. Dentro de esta realización preferente, el film de lípidos comprende además 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2- dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG). Preferentemente,
- 10 la relación en masa de los fosfolípidos DPPC: DSPC es de aproximadamente 6:4. También de forma preferente, la proporción de DSPE-PEG se encuentra en torno a un 5% en peso con respecto al peso total del film de lípidos.

En otra forma de realización preferente, la solución tampón es una solución de HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanesulfónico) de pH 7.4.

- 15 En otra forma de realización preferente, el solvente orgánico es una mezcla de dietileter y cloroformo en una relación aproximada de 1:1 en volumen. Más preferiblemente, la relación en volumen de fase orgánica:fase acuosa es de aproximadamente 4:1.

De forma particular, el sonicado de la etapa c) se realiza en un baño sonicador hasta que los liposomas se forman de manera espontánea y la muestra aparece dispersa en una sola fase. Preferiblemente esta etapa de sonicado se efectúa durante 3 a 5 minutos.

20

De forma preferente, la eliminación del disolvente orgánico se realiza mediante evaporación, por ejemplo con rotovapor, a una temperatura de entre 35 y 55°C, más preferiblemente a 40°C, y a una velocidad de rotación de entre 100 y 150 rpm, más preferiblemente a 120 rpm.

25

De forma preferente, la sonicación de la etapa (f) se realiza en un baño sonicador a una temperatura superior a la de su fase de transición, preferiblemente a más de 60°C, para controlar el tamaño del nanoliposoma. Preferiblemente, el nanoliposoma se ajusta a un tamaño medio de entre 75 y 125 nm, preferiblemente entre 85 y 115 nm, más preferiblemente de aproximadamente 95-105 nm.

30

La funcionalización del nanoliposoma con el péptido (etapa (g)) se realiza mediante la adición de al menos 100 µg del péptido modificado, más preferentemente de al menos

125 μg y aún más preferentemente de al menos 150 μg , a la muestra de nanoliposomas manteniendo en agitación y temperatura ambiente durante más de 10 horas, y más preferentemente entre 12 y 16 horas. Preferentemente, el péptido se encuentra disuelto en una solución tampón a un pH de en torno a 6-6.5.

- 5 Dicho péptido se encuentra modificado con un grupo sulfhidrilo en un extremo del mismo. La maleimida presente en el conjugado lípido-espaciador-maleimida reacciona con el péptido a través del grupo sulfhidrilo -SH. Dicha reacción se realiza de forma preferente bajo burbujeo de nitrógeno durante al menos una hora para evitar que se oxiden los grupos sulfhidrilo. Se incuba la muestra a temperatura ambiente y con
10 agitación.

Con el fin de proteger los grupos libres de la maleimida, se puede añadir β -mercaptoetanol o cisteína libre en exceso, dializando posteriormente para eliminar el exceso de β -mercaptoetanol y de péptido que no haya reaccionado.

Preferentemente, el péptido es el péptido VIP.

- 15 En una forma de realización particular, los nanoliposomas obtenidos tras la etapa (f) pueden ser purificados mediante, por ejemplo, una columna de Sephadex, preferiblemente G-50.

Asimismo, los nanoliposomas funcionalizados obtenidos tras la etapa (g) pueden ser purificados mediante, por ejemplo, diálisis frente a agua desionizada durante al menos
20 15 horas, preferentemente durante al menos 20 horas, y mucho más preferentemente durante 24 horas.

El procedimiento que conduce a estos nanoliposomas permite la funcionalización con el péptido de manera que queda libre el extremo carboxilo-terminal, dejando así intacta su capacidad de interacción con sus receptores específicos, lo que permite formular
25 estrategias de detección y liberación selectivo *in vivo* de fármacos sobre células que interese eliminar (como es el caso de las células tumorales), o bien expandir (mediante la administración de factores tróficos) en función de la patología que se pretenda abordar. Por lo tanto, los nanoliposomas de la invención pueden incorporar además un principio activo.

- 30 Como se emplea aquí, el término "principio activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término

incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

5 El principio activo puede ser tanto de carácter hidrofílico como hidrofóbico. En el primer caso se encuentra incorporado en el núcleo acuoso del liposoma, mientras que en el segundo caso se encuentra incorporado en la bicapa lipídica del nanoliposoma.

En una realización preferente, el principio activo tiene una actividad antitumoral. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el principio activo tiene actividad antiinflamatoria o una actividad antiinflamatoria. Más preferentemente, el
10 principio activo es doxorubicina.

El encapsulamiento del principio activo en el nanoliposoma se puede realizar mediante la técnica de gradiente osmótico tal como se describe en la parte experimental.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende un nanoliposoma tal como se ha definido previamente y un principio
15 activo capaz de diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero.
20 Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Las composiciones pueden combinarse con
25 varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz, etc.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal,
30 incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, ... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de principio activo, o de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o de sus combinaciones, que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención, estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta

un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a los principios activos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del nanoliposoma de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular. En una realización preferida, la enfermedad que cursa con proliferación celular se selecciona de la lista que comprende: neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como son los de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria. En una realización más preferida, la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer de próstata.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de nanoliposomas funcionalizados con péptido VIP

Como primer paso se obtuvo un film de lípidos mediante evaporación de fase reversa de una mezcla que contenía 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-maleimida] o (DSPE-PEG-maleimida).

El film formado se rehidrató con una solución tampón de HEPES a pH 7.4 y se añadió una mezcla de dietileter y cloroformo en una proporción 1:1 en volumen, de tal manera que la relación en volumen de la fase orgánica:fase acuosa fue de 4:1. Se formó así un sistema de dos fases. Dicho sistema fue sometido a una etapa de sonicación durante unos 3-5 minutos hasta que la muestra apareció dispersa en una sola fase. El solvente orgánico se eliminó mediante rotoevaporación a una temperatura de 40°C y a

30

una velocidad de 120 rpm, hasta que se alcanzó una fase gel. A continuación el gel se convirtió en una suspensión acuosa donde se encontraban dispersos los liposomas.

5 Dichos liposomas se sometieron a una etapa adicional de sonicación para reducir su tamaño y convertirlos así en nanoliposomas. La sonicación se realizó en un baño sonicador a una temperatura superior a 60°C. A continuación, se purificaron los nanoliposomas mediante la utilización de una columna de Sephadex G-50.

10 La funcionalización de los nanoliposomas con el VIP se realizó mediante la adición de 150 µg de dicho péptido modificado con una molécula de cisteína sobre la suspensión acuosa de los nanoliposomas, manteniendo en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas.

Posteriormente, los nanoliposomas se purificaron mediante diálisis frente a agua desionizada durante 24 horas.

15 Una vez funcionalizados los nanoliposomas, se procedió a la cuantificación de VIP en superficie mediante la utilización de un sistema comercial denominado LavaPep - peptide quantification kit™ (Fluorotechnics) basado en la detección de fluorescencia de los complejos péptido/fluoróforo. Los resultados relativos a esta cuantificación se muestran en la Figura 2.

20 Asimismo, los nanoliposomas funcionalizados se caracterizaron por su tamaño mediante la técnica de Dispersión de la Luz Láser (Dynamic Light Scattering, DLS) obteniéndose valores de en torno a 100 nm tal como se muestra en la figura 3.

Ejemplo 2. Especificidad y efectividad de los nanoliposomas funcionalizados con VIP en el reconocimiento específico de las células que expresan sus receptores.

25 Células DU145 (n=4) (línea celular humana de cáncer de próstata) fueron estimuladas durante 30 minutos con los nanoliposomas funcionalizados con VIP obtenidos según el ejemplo 1 a una concentración efectiva funcionalizada de VIP de 10⁻⁷M.

30 La producción de AMPc se midió mediante un ensayo de bioluminiscencia utilizando el ensayo de Promega cAMP-GLO™ según las instrucciones del fabricante. Este ensayo está basado en la disminución de la producción de luz acoplado a luciferasa cuando las concentraciones aumentadas de AMPc producen una activación de la proteína quinasa A y una disminución concomitante del ATP disponible para la reacción de detección antes indicada.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos en células y demuestra una producción de AMPc incrementada específicamente tras estimulación de las células con los nanoliposomas funcionalizados.

5 Ejemplo 3. Encapsulación de la doxorubicina

El encapsulamiento de la doxorubicina se realiza mediante la técnica de gradiente osmótico, en el cual se utilizan dos tampones a pH diferentes. El primero consiste en el sulfato de amonio 250 mM pH 5.5, que es la fase acuosa en la síntesis de evaporación reversa, por lo que dentro y fuera del nanonanoliposoma se encuentra este tampón. Posteriormente se hace pasar la muestra de nanonanoliposomas por una
 10 columna de Sephadex G-50 previamente lavada con buffer HEPES salino pH 7.4 para recoger así los nanoliposomas dispersos en este mismo tampón. Esta diferencia de osmolaridad dentro y fuera del nanoliposoma crea un gradiente osmótico a través de la membrana. Una vez creado este gradiente osmótico se añade doxorubicina disuelta
 15 en agua a la muestra de nanoliposomas y se deja incubar durante 90 minutos a una temperatura superior a la de transición, en nuestro caso a 60 °C, ya que la temperatura de transición de nuestro nanoliposoma es de 46°C. Esta temperatura hace que los nanoliposomas se hagan más fluidos, se formen huecos en su membrana, y penetre la doxorubicina. El movimiento del agua hacia el interior de los
 20 nanoliposomas es debido al gradiente osmótico y a los huecos en la membrana que facilita la encapsulación de la doxorubicina y permite llegar a valores de eficiencia de encapsulación cercanos al 90%.

Posteriormente se purifica la muestra mediante una columna de Sephadex G-50 para eliminar la doxorubicina no incorporada y se mide la eficiencia de encapsulación
 25 mediante el espectrofotómetro de fluorescencia, midiendo la muestra antes y después de ser purificada y también después de añadir tritón al 1% (de esta forma se rompe el nanoliposoma y el fármaco del interior se libera).

Mediante esta ecuación se calcula el porcentaje (%) de encapsulación del fármaco:

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = (A - B / C) \times 100$$

30 A= Intensidad de la muestra purificada tras añadir tritón al 1%.

B= Intensidad de la muestra purificada sin tritón al 1%.

C= Intensidad de la muestra antes de purificarla y tras añadir tritón al 1%.

Ejemplo 4. Capacidad citotóxica de la doxorubicina encapsulada en un nanoliposoma funcionalizado con VIP

Células DU-145 (n=4) (línea celular humana de cáncer de próstata) fueron tratadas durante 48 horas con doxorubicina soluble, con doxorubicina encapsulada en liposomas y con doxorubicina encapsulada en nanoliposomas funcionalizados con VIP. La figura 5 muestra las fotografías de microscopía óptica obtenidas en todos los casos y su comparación con una muestra de células sin tratar. Se observa el efecto citotóxico aumentado de la doxorubicina en presencia de nanoliposomas funcionalizados con el péptido VIP.

Asimismo, como método de referencia para estudiar la citotoxicidad *in vitro*, se utilizó la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa). Para ello, la mencionada línea celular se expuso al fármaco (10 µg/mL) durante 24 horas. La figura 6 muestra el histograma obtenido para todas las muestras analizadas. A mayor números de células muertas, mayor liberación al medio del enzima LDH. De esta forma, la muerte celular es proporcional a la cuantificación de actividad LDH. Se utiliza como referencia de citotoxicidad absoluta el resultado de tratar las células con un detergente (Triton X100 al 1%), que lógicamente disuelve las membranas de las células y mata al total de la población expuesta.

Se puede observar una mayor liberación de LDH (un mayor número de células muertas) cuando la doxorubicina se encuentra encapsulada en los nanoliposomas funcionalizados con VIP.

Este ensayo pone de manifiesto que la funcionalización de los nanoliposomas con el péptido VIP aumenta la capacidad citotóxica de la doxorubicina, mejorando la efectividad de este principio activo, lo que posibilita la incorporación del fármaco en la composición liposomal a concentraciones más bajas que las empleadas en otras formulaciones convencionales del estado de la técnica.

REIVINDICACIONES

- 1- Un nanoliposoma funcionalizado en su superficie con un péptido, donde el nanoliposoma comprende:
- un conjugado lípido-espaciador-maleimida; y
 - un péptido modificado con un grupo sulfhidrilo;
- 5 de manera que el péptido se encuentra unido covalentemente al nanoliposoma a través de la reacción entre la maleimida del conjugado y el grupo sulfhidrilo del péptido modificado.
- 2- Nanoliposoma según la reivindicación 1, donde el lípido presente en el conjugado es un fosfolípido.
- 10 3- Nanoliposoma según reivindicación 2, donde el fosfolípido se selecciona entre 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) y combinaciones de los mismos.
- 15 4- Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el espaciador presente en el conjugado es polietilenglicol.
- 5- Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el conjugado lípido-espaciador-maleimida es 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-maleimida] (DSPE-PEG-maleimida).
- 20 6- Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el péptido es el péptido intestinal vasoactivo (VIP).
- 7- Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el péptido se encuentra modificado con una molécula de cisteína.
- 25 8- Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que además comprende uno o más fosfolípidos libres y/o uno o más fosfolípidos conjugados con polietilenglicol.
- 9- Nanoliposoma según la reivindicación 8, donde los fosfolípidos libres se seleccionan entre 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-distearoil-
- 30

sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) y combinaciones de los mismos.

5

10-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, donde el fosfolípido conjugado con polietilenglicol es 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG).

10

11-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC).

12-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende:

15

- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-maleimida] o (DSPE-PEG-maleimida);
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG);
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC),
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), y
- un péptido modificado con un grupo sulfhidrilo;

20

de manera que el péptido se encuentra unido covalentemente al nanoliposoma a través de la reacción entre la maleimida del conjugado y el grupo sulfhidrilo del péptido modificado.

13-Nanoliposoma según reivindicación 12, donde el conjugado DSPE-PEG-Maleimide se encuentran en una proporción de en torno a un 10% en peso con respecto al peso total de lípidos.

25

14-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13, donde el DSPE-PEG se encuentran en una proporción de en torno a un 5% en peso con respecto al peso total de lípidos.

30

- 15-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4.
- 5 16-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde el péptido es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) modificado con una molécula de cisteína.
- 17-Nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde su diámetro medio se encuentra comprendido entre 75 y 125 nm.
- 10 18-Un procedimiento para la preparación de los nanoliposomas según se define en las reivindicaciones 1 a 17, que comprende:
- a) formar un film de lípidos que comprende un conjugado lípido-espaciador-maleimida como se ha definido previamente;
 - b) rehidratar el film con una solución tampón a un pH esencialmente neutro y añadir un solvente orgánico para formar un sistema de dos fases;
 - 15 c) someter el sistema de dos fases a sonicación para formar liposomas dispersos en una sola fase;
 - d) eliminar el solvente orgánico hasta obtener una fase gel;
 - e) convertir el gel en una suspensión acuosa donde quedan los liposomas;
 - 20 f) someter la suspensión acuosa a sonicación para convertir los liposomas en nanoliposomas;
 - g) añadir el péptido modificado a la suspensión de los nanoliposomas para formar nanoliposomas funcionalizados.
- 19-Procedimiento según reivindicación 18, donde el film de lípidos comprende además al menos un fosfolípido y/o al menos un fosfolípido conjugado con una molécula de PEG.
- 25 20-Procedimiento según reivindicación 19, donde el film de lípidos comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)] (DSPE-PEG).
- 30

- 21- Procedimiento según reivindicación 20, donde el conjugado DSPE-PEG-Maleimide se encuentran en una proporción de en torno a un 10% en peso con respecto al peso total de lípidos.
- 5 22- Procedimiento según reivindicación según cualquiera de las reivindicaciones 20 y 21, donde el DSPE-PEG se encuentran en una proporción de en torno a un 5% en peso con respecto al peso total de lípidos.
- 23- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 202 a 22, donde el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4.
- 10 24- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, donde el solvente orgánico consiste en una mezcla de dietiléter y cloroformo en una relación aproximada de 1:1 en volumen.
- 25- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18-24, donde la sonicación en la etapa (f) se realiza a una temperatura superior a 60°C.
- 15 26- Un nanoliposoma funcionalizado con un péptido en su superficie obtenible según un procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25.
- 20 27- Un nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 26, que además comprende un principio activo capaz de diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad.
- 28- Nanoliposoma según reivindicación 27, donde el principio activo tiene una actividad antitumoral.
- 29- Nanoliposoma según reivindicación 28, donde el principio activo es doxorubicina.
- 25 30- Una composición farmacéutica que comprende un nanoliposoma tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y 26 a 29.
- 31- Uso del nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y 26-29, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular.
- 30 32- Uso del nanoliposoma según la reivindicación 31, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular se selecciona de la lista que comprende

neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como cáncer de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria.

33- Uso del nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular es cáncer de próstata.

FIGURA 1

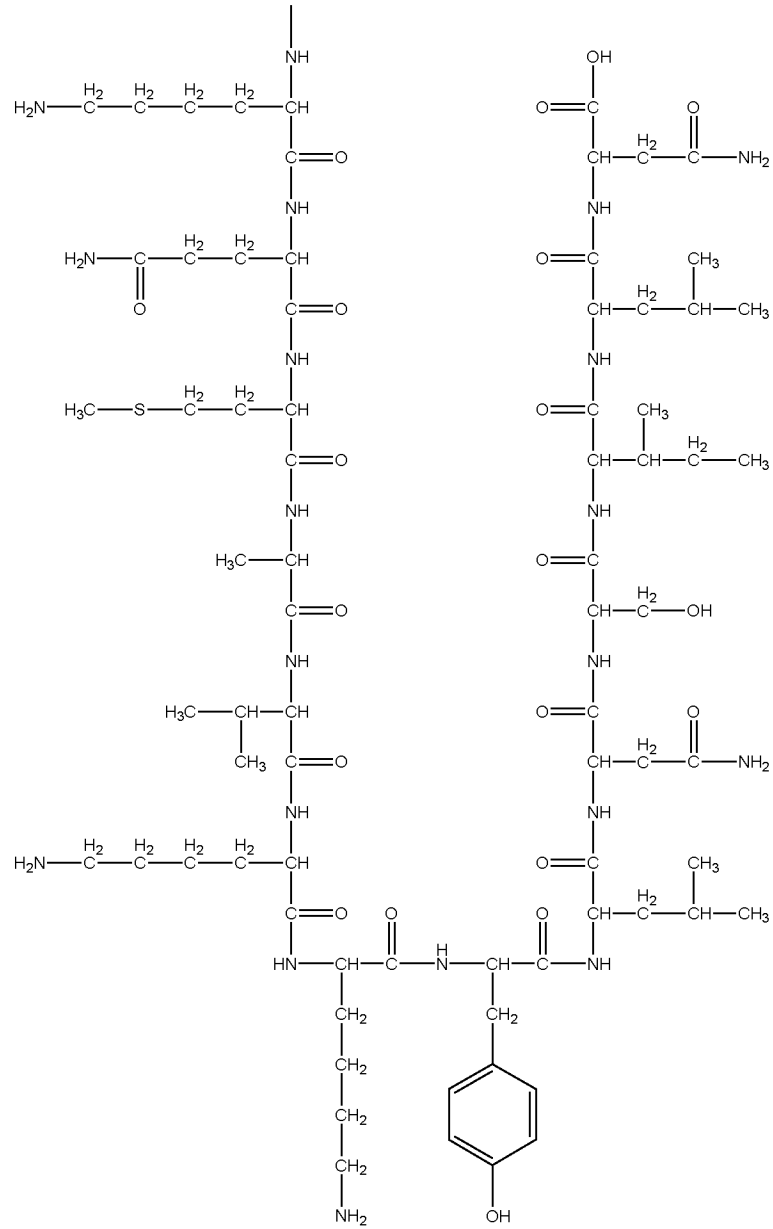


FIGURA 2

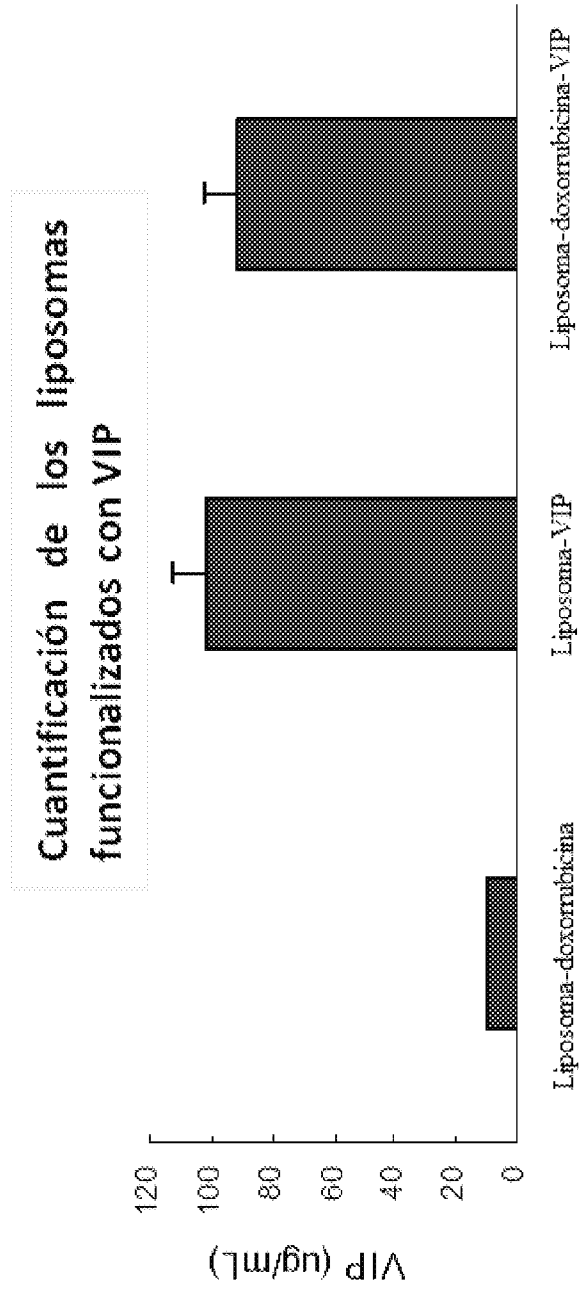


FIGURA 3

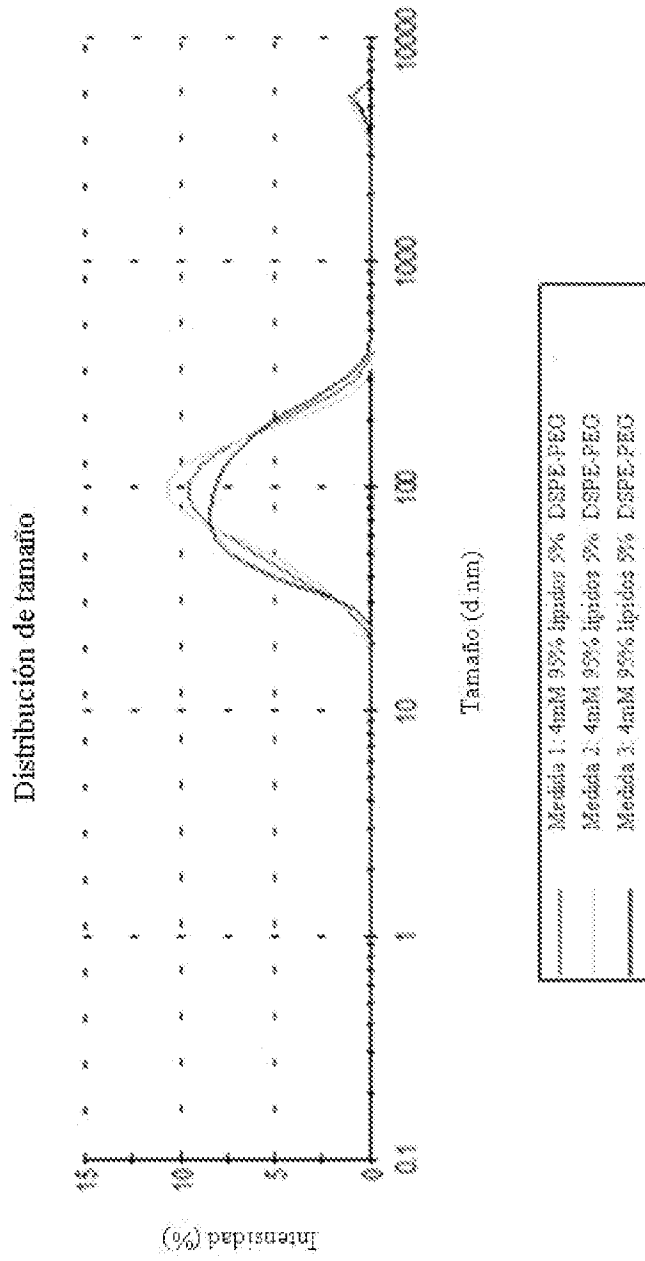


FIGURA 4

Producción intracelular de AMPc

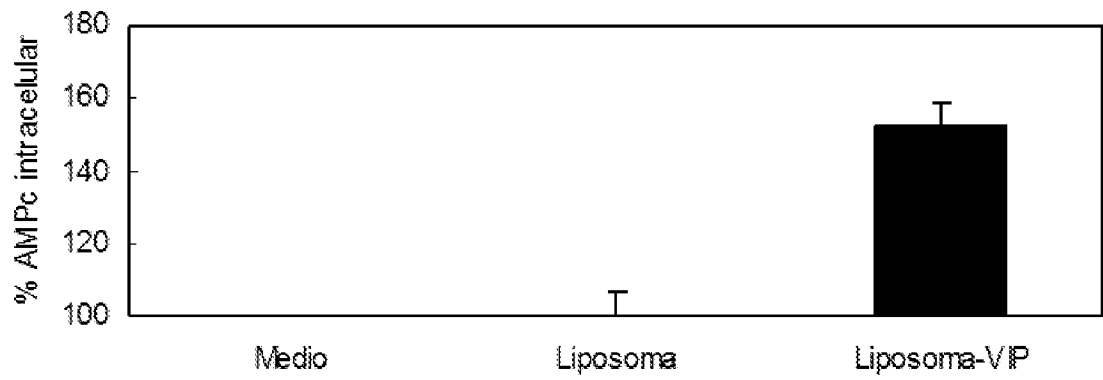


FIGURA 5

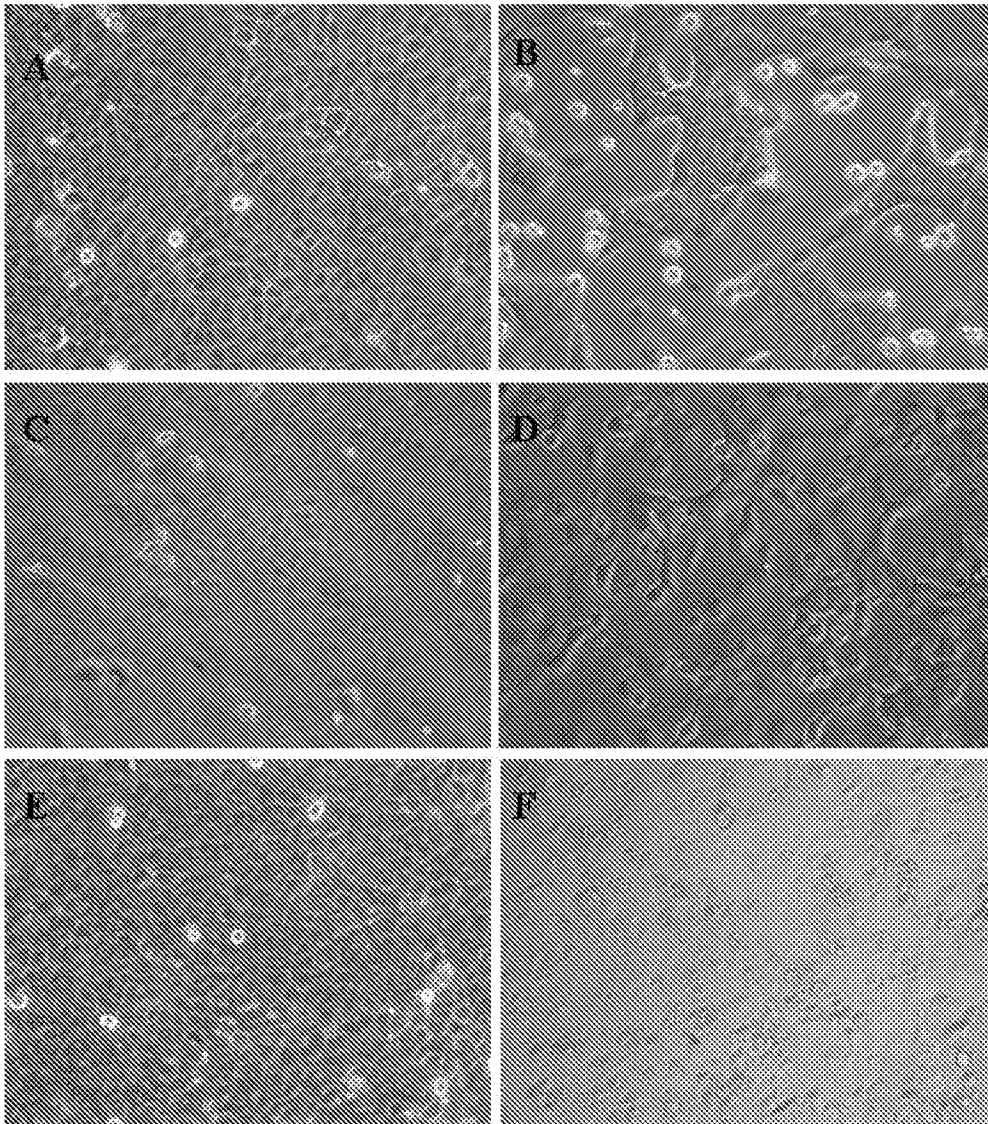
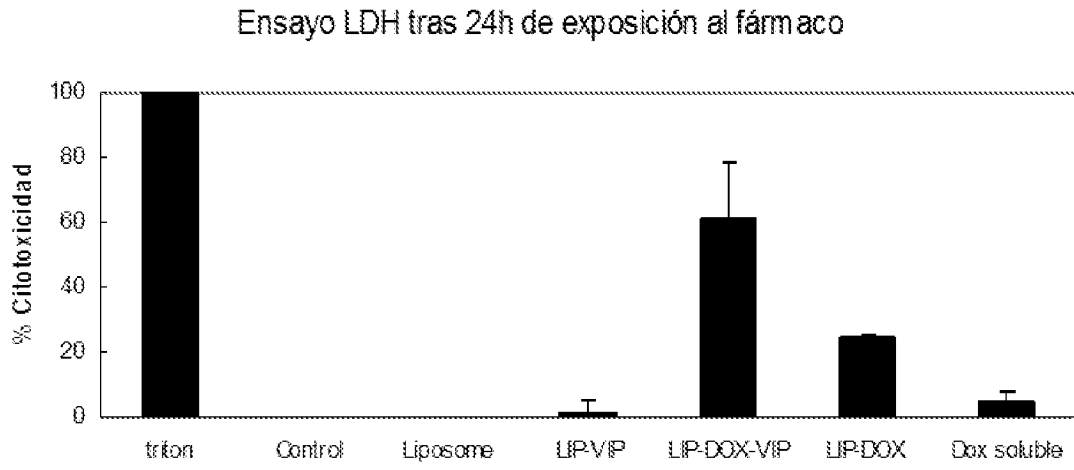


FIGURA 6





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130185

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 2009142525 A2 (UNIVERSIDADE DE COIMBRA) 26.11.2009, ejemplo 1; reivindicación 9.	1-5,7-11,17-33 6,12-16
X Y	NALLAMOTHU, R. et al. "A tumor vasculature targeted liposome delivery system for Combrestatin A4: design, characterization and in vitro evaluation". AAPS PHARM SCI TECH. 2006. Vol. 7, N.º. 2, páginas E1-E10, todo el documento especialmente figuras 1 y 2.	1-5,7-10,30-33 6,11-29
X	DAGAR, S. et al. "VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies". JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. 28.08.2003. Vol. 91, N.º. 1-2, páginas 123-133; todo el documento, especialmente materiales y métodos.	1,2,6-8,27,28, 30-33
X	SCHIFFELERS, R .M. e t al. " Anti-tumor ef ficacy of tumor va sculature-targeted l iposomal doxorubicin". 28.08.2003. Vol. 91, N.º. 1-2, páginas 115-122; todo el documento especialmente materiales y figura 1.	1-5,7-10,23-33

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.10.2012

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/127 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61K35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 12-17	SI
	Reivindicaciones 1-11, 18-33	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-33	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP en su superficie. El nanoliposoma de la invención contiene un conjugado de estructura LIPIDO-PEG-MALEIMIDA en el que el lípido es el fosfolípido DSPE. También comprende DSPE-PEG, DSPC y DPPC. El péptido VIP mantiene su extremo carboxilo libre de forma que puede unirse a su receptor específico que se expresa en algunas células tumorales y por el extremo amino, en el que se ha introducido una cisteína, se une a la maleimida. El nanoliposoma de la invención se utiliza para dirigir fármacos antitumorales hacia células cancerígenas que expresan en su superficie el receptor del péptido VIP.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009142525 A2 (UNIVERSIDADE DE COIMBRA)	26.11.2009
D02	NALLAMOTHU, R. et al. "A tumor vasculature targeted liposome delivery system for Combrestatin A4: design, characterization and in vitro evaluation". AAPS PHARM SCI TECH. 2006. Vol. 7, N°. 2, páginas E1-E10, todo el documento especialmente figuras 1 y 2.	
D03	DAGAR, S. et al. "VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies". JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. 28.08.2003. Vol. 91, N°. 1-2, páginas 123-133; todo el documento, especialmente materiales y métodos.	
D04	SCHIFFELERS, R.M. et al. "Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin". 28.08.2003. Vol. 91, N°. 1-2, páginas 115-122; todo el documento especialmente materiales y figura 1.	

El documento D01, describe un nanoliposoma que transporta un fármaco hacia el receptor del péptido que se localiza en su superficie. El nanoliposoma puede estar constituido por DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimida (páginas 11 y 20) y tiene en su superficie un péptido modificado con un grupo SH que se une a la maleimida.

El documento D02, describe un liposoma dirigido que está funcionalizado en su superficie con un péptido que tiene afinidad por una integrina expresada en una célula tumoral. DSPE-PEG y DSPE-PEG-maleimida son componentes del liposoma y la Figura 2 del documento, representa la forma en la que el péptido se acopla al liposoma.

El documento D03, describe un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP, que tiene entre sus componentes DSPE-PEG. El liposoma contiene el radionúclido Tc99m-HMPAO y se utiliza para realizar un diagnóstico temprano de cáncer de mama que presenta alta densidad de receptores de VIP.

El documento D04, presenta los resultados de eficacia antitumoral de un liposoma que contiene doxorubicina, funcionalizado con un péptido RGD acoplado a DSPE-PEG-maleimida que lo dirige a un carcinoma de colon que expresa $\alpha\beta 3$ integrina.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Reivindicaciones 12-17

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, un nanoliposoma que tenga como componentes exclusivamente DSPE-PEG-Maleimida, DSPE-PEG, DSPC y DPPC funcionalizado con el péptido VIP. Las reivindicaciones 12-17 cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

Reivindicaciones 1-11, 17-33

Las reivindicaciones 1-11 y 17-33 en la medida en que dependen de las anteriores, están redactadas de una forma tan general que alcanzan el contenido de la información divulgada en los documentos D01-D04. Los nanoliposomas funcionalizados en su superficie con péptidos para así, ser dirigidos a receptores específicos están ampliamente descritos en el estado de la técnica. También están ampliamente descritos los nanoliposomas que tienen entre sus componentes DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimida. El liposoma descrito en el documento D01, tiene entre sus componentes DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimida. El liposoma que se describe en el documento D02, está formado entre otros por DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimida. El liposoma se funcionaliza en su superficie con un péptido mediante el mismo mecanismo descrito en la presente solicitud y tiene un tamaño de 100-120 nm y el péptido está modificado con un grupo sulfhidrilo. Los documentos D03 y D04, describen respectivamente un liposoma que tiene entre sus componentes DSPE-PEG funcionalizado con el péptido VIP que se dirige al receptor de VIP expresado por células de cáncer de mama y un liposoma funcionalizado con un péptido RGD que se une al componente DSPE-PEG-Maleimida del liposoma y que transporta doxorubicina hacia células tumorales que expresan el receptor del péptido RGD. Las reivindicaciones 1-11, 17-33, no cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-33

Del contenido de los documentos D01-D04, resultaría obvio para un experto en la materia la obtención de un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP en su superficie y formado por los fosfolípidos DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimide todos ellos conocidos en el estado de la técnica como componentes de liposomas. La combinación de los 4 componentes del nanoliposoma de la invención y su funcionalización con el péptido VIP, no supone un gran esfuerzo inventivo respecto a lo descrito en el estado de la técnica anterior; por tanto, las reivindicaciones 1-33, carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito del Art. 8 de la Ley de Patentes 11/1986.