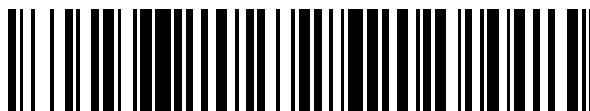


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 272**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2007 PCT/US2007/010357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2007 WO07127439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07776432 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2020988**

54 Título: **Composiciones que comprenden proteínas o polipéptidos fusogénicos derivados de la prosaposina para aplicación en sistemas de suministro de fármacos transmembrana**

30 Prioridad:

28.04.2006 US 745969 P

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

08.11.2017

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(100.0%)
3333 BURNET AVENUE
CINCINNATI, OH 45229-3039, US**

72 Inventor/es:

QI, XIAOYANG

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 641 272 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

Composiciones que comprenden proteínas o polipéptidos fusogénicos derivados de la prosaposina para aplicación en sistemas de suministro de fármacos transmembrana

5

Esta invención se hizo en parte con el apoyo gubernamental bajo la concesión No. RO1 DK57690-01, concedida por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

CAMPO DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere a métodos para suministrar agentes farmacéuticos o terapéuticos a través de membranas biológicas, donde el agente está contenido dentro o intercalado en una membrana de fosfolípido y el suministro es facilitado por una proteína de fusión de la membrana. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para mejorar el transporte y el suministro de agentes farmacéuticos a través y/o dentro de las membranas dérmicas y mucosas o la barrera hematoencefálica, donde el agente farmacéutico está contenido dentro de un liposoma y el suministro se facilita usando saposina C, que está en asociación con el liposoma.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

La eficacia terapéutica de agentes farmacéuticos o terapéuticos se basa en la administración de dosis adecuadas de un agente farmacéutico al sitio de acción. Se han desarrollado muchos modos de suministro, incluyendo, por ejemplo, administración enteral (oral), parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutánea) y tópica. En la mayoría de los casos se elige el sistema de administración para un suministro confiable de la dosis y por conveniencia.

25

Típicamente, la administración parenteral es el medio más confiable para suministrar un fármaco a un paciente.

30

Véase, Goodman et al., Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, Elmsford, N.Y. (1990) y Pratt et al. Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology, Churchill Livingstone, Nueva York, N.Y. (1990). Cada mecanismo parenteral asegura que una dosis prescrita del agente farmacéutico se inserte en el compartimiento del fluido del cuerpo donde puede ser transportado. La desventaja de estos modos de suministro es que requieren un procedimiento invasivo. La naturaleza invasiva de la administración es inconveniente, dolorosa y sujeta a contaminación infecciosa.

35

La administración enteral y tópica son más convenientes, generalmente no dolorosas, y no predisponen a la infección, sin embargo, ambas tienen utilidad limitada. Las superficies gastrointestinal y dérmica presentan formidables barreras para el transporte y, por lo tanto, algunos agentes farmacéuticos no se absorben a través de estas superficies. Otro inconveniente de los modos de administración dirigidos al paciente (enteral, tópico y subcutáneo) es el cumplimiento por parte del paciente. Los agentes farmacéuticos que tienen una semivida corta requieren múltiples dosis diarias. A medida que aumenta el número de dosis, el cumplimiento del paciente y la eficacia terapéutica disminuyen. Los esquemas de administración simplificados y/o menos frecuentes pueden ayudar a optimizar el cumplimiento del paciente. Wilson et al. (1991) Harrison's Principles of Internal Medicine, 12ª Ed., McGraw-Hill, Inc., Nueva York, N.Y.

40

45

La piel es una barrera eficaz para la penetración de sustancias solubles en agua y la velocidad de absorción del agente farmacéutico transdérmico se determina principalmente por la solubilidad en lípidos, la solubilidad en agua y la polaridad del agente. Los agentes farmacéuticos altamente polares o solubles en agua son bloqueados eficazmente por la piel. Incluso los agentes farmacéuticos muy lipofílicos penetran en la dermis muy lentamente en comparación con la velocidad de penetración a través de las membranas celulares. Véase Pratt et al. citado más arriba.

50

Los esfuerzos para desarrollar modos más eficaces y convenientes de administración farmacéutica han conducido al desarrollo de sistemas de administración transdérmica. Muchos sistemas transdérmicos actuales de suministro de agentes farmacéuticos dependen de que los agentes farmacéuticos se absorban cuando se mezclan con vehículos inertes. Véase Cooper et al. (1987) "Penetration Enhancers", en Transdermal Delivery of Drugs, vol. II, Kydonieus et al., Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla. Pocos agentes farmacéuticos se ajustan a este perfil y los que sí lo hacen no siempre son absorbidos de manera previsible. Se han desarrollado diversas formas de potenciadores químicos, tales como los que refuerzan la lipofilicidad, para mejorar el transporte transdérmico cuando se mezclan físicamente con ciertos agentes terapéuticos y proporcionan una absorción más predecible. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.645.502, 4.788.062, 4.816.258, 4.900.555, 3.472.931, 4.006.218 y 5.053.227. También se han acoplado portadores a agentes farmacéuticos para mejorar el transporte intracelular. Véase Ames et al. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70: 456-458 y (1988) Proc. Int. Symp. Cont. Rel. Bioact. Mater., 15: 142.

55

60

65

Similar a los problemas inherentes a la administración transdérmica de fármacos, la barrera hematoencefálica es un obstáculo para la administración de fármacos al SNC. De hecho, la barrera hematoencefálica se considera un

"cuello de botella" en el desarrollo de fármacos cerebrales, y es quizás la limitación más importante en el futuro crecimiento de neuroterapéuticos. (Pardridge, WM, The Brain-Brain Barrier: Bottleneck en Brain Drug Development, The Journal of American Society for NeuroTherapeutics Experimental, Vol 2, 3-14, enero de 2005. Pardridge, W.M. Brain drug targeting: the future of brain drug development. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001). La BBB está formada por el endotelio capilar cerebral e impide el transporte de aproximadamente el 100% de moléculas grandes (como anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes, terapéuticos génicos o antisentido) y más que el 98% de todos los fármacos de moléculas pequeñas en el cerebro. Aunque la masa molecular promedio de un fármaco activo en el SNC es de 357 daltons, incluso una molécula pequeña de 100 daltons, tal como la histamina, no pasa a través de la BBB cuando se infunde en un ratón y se permite que se distribuya durante treinta minutos. De hecho, una revisión de la base de datos de la Química Medicinal Integral demuestra que, de más de 7.000 fármacos de molécula pequeña, solamente el 5% trata el CNS, y este 5% trata solamente la depresión, la esquizofrenia, y el insomnio.

Por lo tanto, la mayoría de los fármacos no atraviesan la BBB. Desafortunadamente, muchos trastornos del sistema nervioso central (SNC) podrían beneficiarse de una terapia farmacológica mejorada dirigida al SNC. Aunque hay relativamente poca investigación con respecto a los agentes que se sabe que atraviesan la BBB, hay características que son predictivas de la probabilidad de éxito de suministro en el SNC. Estas son: 1) una masa molecular por debajo de un umbral de 400-500 Dalton, y 2) alta solubilidad lipídica. Actualmente, sólo cuatro categorías de trastornos del SNC responden a tales moléculas, incluyendo trastornos afectivos, dolor crónico y epilepsia. La migraña puede considerarse un trastorno del SNC, y también podría incluirse en esta categoría. Por el contrario, los pacientes con enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la ELA, la esclerosis múltiple, el neurosida, el cáncer de cerebro, el accidente cerebrovascular, traumatismos cerebrales o de la médula espinal, autismo, trastornos de almacenamiento lisosómico, síndrome de X frágil, ataxias heredadas y la ceguera tienen opciones muy limitadas con respecto a los tratamientos farmacéuticos. (Ha habido cierto éxito con el tratamiento con L-DOPA en pacientes con Parkinson, y la esclerosis múltiple puede tratarse con citoquinas que actúan sobre el sistema inmune periférico). (Véase, en general, Partridge, citado anteriormente).

En muchos de los trastornos enumerados anteriormente, el suministro a través de la BBB es el problema limitante en terapia génica o terapia de sustitución enzimática. Muchos de estos trastornos podrían ser tratados con fármacos, enzimas o genes ya descubiertos. Sin embargo, estos fármacos no atraviesan la BBB y no pueden ser considerados para uso terapéutico por esa razón. Debido a la impermeabilidad de la BBB, se deben utilizar otros enfoques para la administración de fármacos en el SNC. Estos incluyen el uso de pequeñas moléculas, el suministro de fármacos transcraneales al cerebro, y la ruptura de la BBB. Sin embargo, ninguno de estos enfoques proporciona soluciones al problema de la BBB que se pueden implementar prácticamente en un gran número de pacientes (Pardridge, W.M., "The Blood-Brain Barrier").

Las saposinas, una familia de glicoproteínas pequeñas (~ 80 aminoácidos) estables al calor, son esenciales para la actividad hidrolítica *in vivo* de varias enzimas lisosómicas en la vía catabólica de los glicoesfingolípidos (véase Grabowski, GA, Gatt, S. y Horowitz, M. (1990) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 25, 385-414, Furst, W. y Sandhoff, K., (1992) Biochim Biophys Acta 1126, 1-16; Kishimoto, Y., Kiraiwa, M., y O'Brien, JS (1992) J. Lipid, Res. 33, 1255-1267). Cuatro miembros de la familia de la saposina, A, B, C y D, se hidrolizan proteolíticamente a partir de una única proteína precursora, prosaposina (véase Fujibayashi, S., Kao, FT, Hones, C., Morse, H., Law, M., y Wenger, DA (1985) Am. J. Hum. Genet. 37, 741-748, O'Brien, JS, Kretz, KA, Dewji, N., Wenger, DA, Esch, F. y Fluharty, AL (1988) Science 241, 1098-1101, Rorman, EG, y Grabowski, GA (1989) Genomics 5, 486-492, Nakano, T., Sandhoff, K., Stumper, J. Christomanou H. y Suzuki, K. (1989) J. Biochem. (Tokio) 105, 152-154, Reiner, O., Dagan, O., y Horowitz, M. (1989) J. Mol. Neurosci., 1, 225-233). Se han reportado las secuencias completas de aminoácidos para las saposinas A, B, C y D, así como la organización genómica y la secuencia de ADNc de la prosaposina (véase Fujibayashi, S., Kao, FT, Jones, C., Morse, H., Law, M. y Wenger, DA (1985) Am. J. Hum. Genet. 37, 741-748, O'Brien, JS, Kretz, KA, Dewji, N., Wenger, DA, Esch, F. y Fluharty, AL (1988) Science 241, 1098-1101, Rorman, EG, y Grabowski, GA (1989) Genomics 5, 486-492). Una deficiencia completa de prosaposina con mutación en el codón de inicio provoca el almacenamiento de múltiples sustratos de glicoesfingolípidos que se asemejan a una deficiencia de hidrolasa lisosomal combinada (véase Schnabel, D., Schroder, M., Furst, W., Klien, A., Hurwitz, R., Zenk, T., Weber J., Harzer, K., Paton, BC, Poulos, A., Suzuki, K. y Sandhoff, K. (1992) J. Biol. Chem. 267, 3312-3315).

Las saposinas se definen como proteínas activadoras de esfingolípidos o coenzimas. Estructuralmente, las saposinas A, B, C y D tienen aproximadamente 50-60% de similitud incluyendo seis residuos de cisteína estrictamente conservados (véase Furst, W. y Sandhoff, K., (1992) Biochim. Biophys Acta 1126,1-16) que forman tres puentes disulfuro intradominio cuyas ubicaciones son idénticas (véase Vaccaro, AM, Salvioli, R., Barca, A., Tatti, M., Ciaffoni, F., Maras, B., Siciliano, R., Zappacosta, F, Amoresano, A., y Pucci, P. (1995) J. Biol. Chem. 270, 9953-9960). Todas las saposinas contienen un sitio de glicosilación con ubicación conservada en la mitad de la secuencia del extremo terminal N, pero la glicosilación no es esencial para sus actividades (véase Qi X. y Grabowski, GA (1998) Biochemistry 37, 11544-11554; Vaccaro, AM, Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D. y Scerch, C. (1995) J. Biol. Chem. 270, 30576-30580). Además, la saposina A tiene un segundo sitio de glicosilación en la mitad del extremo terminal C.

Todas las saposinas y las proteínas similares a la saposina y dominios contienen un "pliegue de saposina" cuando están en solución. Este pliegue es un motivo de haz de hélice α múltiple, caracterizado por una estructura triple de disulfuro conservada y varios polipéptidos anfipáticos. A pesar de esta estructura plegada de saposina compartida en solución, las saposinas y las proteínas similares a la saposina tienen diversas funciones biológicas *in vivo* en la mejora de la degradación de los esfingolípidos lisosómicos (SL) y glicoesfingolípidos (GSL) por hidrolasas específicas. Debido a estos papeles, las saposinas ocupan una posición central en el control del metabolismo de los esfingolípidos lisosómicos y del glicoesfingolípidos (véase Kishimoto, Y., Kiraiwa, M., y O'Brien, JS (1992) *J. Lipid. Res.* 33, 1255; Fujian, S., Kao, FT, Hones, C., Morse, H., Law, M. y Wenger, DA (1985) *Am. J. Gen.* 37:741-748; O'Brien, JS, Kretz, KA, Dewji, N., Wenger, DA, Esch, F. y Fluharty, AL (1988) *Science* 241, 1098-1101).

La característica estructural de estas saposinas es de gran importancia para los diversos mecanismos de activación. Dado que todas estas proteínas tienen una alta similitud de secuencia, pero diferentes mecanismos de acción con las membranas lipídicas, se puede especular que las funciones biológicas específicas de saposinas y proteínas como las saposinas son el resultado de las interacciones diferenciales con los ambientes biológicos de la membrana. *In vitro*, la saposina A mejora la actividad de la β -glucosidasa ácida a una concentración de μ M, pero la deficiencia de saposina C conduce al almacenamiento de glucosilceramida y un fenotipo "como el de la enfermedad de Gaucher" (véase Schnable, D., Schroder, M. y Sandhoff, K. *FEBS Lett.*, 284, 57-59; Rafi, MA, deGala, G., Zhang, XL, y Wenger, DA (1993) *Somat. Cell Mol. Gen.* 19, 1-7). La activación de la saposina B tiene lugar a través de la solubilización y la presentación de sustratos de glicoesfingolípidos a enzimas lisosómicas (véase Furst, W. y Sandhoff, K., (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1126, 1-16).

La saposina C promueve la actividad β -glucosidasa ácida induciendo en la enzima un cambio conformacional a pH ácido (véase Berent, SL, y Radin, NS (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 664, 572-582; Greenberg, P., Merrill, AH, Liotta, DC y Grabowski, GA (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1039, 12-20; Qi, X. y Grabowski, GA (1998) *Biochemistry* 37, 11544-11554). Esta interacción de la saposina C con la enzima ocurre sobre superficies de fosfolípidos cargadas negativamente. *In vitro* e *in vivo*, las saposinas A y D actúan para mejorar la degradación de la galactosilceramida y la ceramida/esfingomielina, respectivamente (véase Harzer, K., Paton, BC, Christomanou, H., Chatelut, M., Levade, T., Hiraiwa, M. y O'Brien, JS (1997) *FEBS Lett.* 417, 270-274; Klien, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K, Harzer, K. y Sandhoff, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1440-1488). Los pacientes que carecen de las saposinas individuales B y C mostraron una forma variante de leucodistrofia metacromática y enfermedad de Gaucher, respectivamente. (véase Wenger, DA, DeGala, G., Williams, C., Taylor, HA, Stevenson, RE, Pruitt, JR, Miller, J. Garen, PD y Balentine, JD (1989) *Am. J. Med. Genet.* 33, 255-265) (véase Christomanou, H., Aignesberger, A., y Linke, RP (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 879-890).

La función fisiológica primaria de la saposina C se ha definido por una enfermedad de almacenamiento de glicoesfingolípidos (GSL) similar a la "enfermedad de Gaucher" neuronopática en pacientes con una deficiencia de la proteína. La saposina C es un activador fisiológico crítico para la enzima lisosómica, β -glucosidasa ácida.

Además de estimular la degradación de la glucosilceramida por la β -glucosidasa ácida, la saposina C tiene varios otros papeles potenciales. Estos incluyen el transporte intermembrana de gangliósidos y GSL, la reorganización y desestabilización de membranas que contienen fosfolípidos y la fusión de vesículas de fosfolípidos ácidos (véase Hiraiwa, M., y Soeda, S. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11254-11858; You, HX, y Yu, L. et al., (2001) *FEBS Lett.* 503, 97-102; You, HX y Qi, X. et al. *J.* 84, 2043-2057; Vaccaro, AM, y Tatti, M. et al., (1994) *FEBS Lett.* 349, 181-186; Wang, Y. y Grabowski, G. et al., *Biochem. Biophys.*, 415: 43-53; Qi, X. y Chu, Z., (2004) *Arch. Biochem. Biophys.*, 424: 210-218). La saposina C se asocia con las membranas de fosfatidilserina (PS) mediante la incorporación de sus hélices de extremo amino y carboxilo en el folíolo externo de las membranas (véase Qi, X y Grabowski, GA, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 27010-27017). Creciente evidencia indica que las interacciones de saposinas con membranas apropiadas son cruciales para su especificidad y actividad.

Además, PSAP, el precursor de las saposinas, es un factor neurotrópico con propiedades neuritogénicas *in vitro*, promotoras del crecimiento de nervios *in vivo* y de protección de la apoptosis (véase Qi, X. y Qin, W. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6874-6880; O'Brien, JS y Carson, GS et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9593-9596; Qi, X. y Kondoh, K. et al. (1999) *Biochemistry* 38, 6284-6291; Kotani, YS y Matsuda, S. et al. (1996) *J. Neurochem* 66, 2019-2025; Koani, Y. y Matsuda, S. et al. (1996) *J. Neurochem*, 66, 2197-2200; Tsuboi, K. y Hiraiwa, M. et al. (1998) *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110, 249-255). Tales funciones neuritogénicas están mediadas a través de secuencias en la mitad del extremo terminal NH₂ de saposina C (véase Qi, X. y Qin, W. et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6874-6880; O'Brien, JS y Carson, GS et al. (1995) *FASEB J.* 9, 681-685). La secuencia mínima requerida para la actividad neuritogénica *in vitro* abarca los residuos de aminoácidos 22-31 de saposina C en seres humanos y ratones. Las funciones neurológicas de PSAP y saposina C están mediadas por la activación de las enzimas en la vía de MAPK a través de un receptor de membrana celular asociado a proteína G en varias células derivadas de neuroglia (véase Campana, WM y Hiraiwa, M. et al. (1996) *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 229, 706-712; Hiraiwa, M. y Campana, WM et al., (1997) *Biochem Biophys Res. Commun.* 240, 415-418).

Los defectos genéticos de PSAP humana y de ratón dan lugar a una deficiencia total de saposina (véase Harzer, K. y Paton, BC et al., (1989) Eur. J. Pediatr. 149, 31-39; Hulkova, H., y Cervenkova, M. et al (2001) Hum. Mol. Genet. 10, 927-940, Fujita, N. y Suzuki, K. et al., Hum. Mol. Gen. 5, 711-725). Esta deficiencia puede conducir a una acumulación aberrante de cuerpos multivesiculares (MVB), como se observa en los fibroblastos de la piel de
 5 pacientes con deficiencia de PSAP (véase Harzer, K. y Paton, BC et al. (1989) Eur. J. Pediatr. 149, 31-39, Burkhardt, JK y Huttler, S. et al. (1997) Eur. J. Cell Biol. 73, 10-18). Además, se ha observado que las células sinusoidales en el hígado de un paciente con deficiencia de PSAP están llenas de inclusiones multivesiculares (véase Sandhoff, K. y Kolter, T. et al. (2000) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 3371-3388, Harzer, K. y Paton, BC et al. (1989) Eur. J. Pediatr. 149, 31-39). También se encontraron estructuras de
 10 MVB similares en los fibroblastos de un paciente con deficiencia en saposina C (véase Pampols, T. y Pineda, M. et al. (1999) Acta Neuropathol., 97, 91-97). En ratones PSAP -/- (doblemente desactivados), se observaron inclusiones consistentes en numerosos cuerpos laminares concéntricos y estructuras granulares densas en una variedad de tejidos y células (véase Oya, Y. y Nakayasu, H. et al., 1998) Acta Neuropathol 96, 29-40). Las secciones delgadas de células PSAP -/- de ratón revelaron una acumulación selectiva de MVB por microscopía
 15 electrónica (véase Morales, C., R. y Zhao, Q. et al. (1999) Biocell 23, 149-160).

Los MVB, un subconjunto de los endosomas tardíos, tienen un papel crucial en las comunicaciones por transporte vesicular entre la red trans-Golgi, la membrana plasmática y los organelos lisosómicos/vacuolares (véase Katzman, DJ y Odorizzi, G. et al. (2002) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 893-905). Una función de MVB es
 20 mantener la homeostasis celular necesaria para el desarrollo y crecimiento neuronal. El modelo hipotético de "endosoma de señalización" explica que el complejo ligando-receptor en una plataforma de señalización endosomal es transportado hacia atrás desde el axón distal al cuerpo celular para promover la expresión génica y la supervivencia de las neuronas (véase Ginty, DD y Segal, RA (2002) Curr. Opin. Neurobiol., 12, 268-274). Las anomalías en las estructuras de MVB en neuronas de ratones PSAP-/- pueden interrumpir el movimiento hacia
 25 atrás de neurotrofinas a través de los transportes de señalización vesicular y pueden perjudicar el desarrollo de células neuronales en el SNC.

La introducción de PSAP exógeno o saposina C en el medio de fibroblastos cultivados del paciente con deficiencia de PSAP invierte la acumulación aberrante de MVB, lo que sugiere que la saposina C es una
 30 molécula reguladora clave en la formación de MVB (véase Burkhardt, J. K. y Huttler, S. et al. (1997) Eur. J. Cell Biol. 73 10-18; Chu, Z., y Witte, D.P. et al. (2004) Exp. Cell Res.).

Además de mediar la formación de MVB, la saposina juega un papel en la fusión a la membrana. La fusión a la membrana es un evento importante en sistemas biológicos que conduce a la secreción, endocitosis, exocitosis,
 35 transporte intracelular, fertilización y desarrollo muscular (véase Christomanou, H., Chabas, A., Pampols, T., y Guardiola, A. (1989) Klin. Wochenschr, 67, 999-1003). La evidencia experimental reciente generada por este inventor ha indicado que las interacciones de membrana saposina-lípido juegan un papel crítico en la fusión de lípidos a la membrana mediada por saposina, facilitando así el transporte de agentes activos a través de estas membranas biológicas.

La presente invención también se refiere a un método para administrar agentes de formación de imágenes a través de membranas celulares incluyendo la barrera hematoencefálica usando liposomas que contienen saposina C. Pueden usarse técnicas no invasivas de formación de imágenes para monitorear la distribución y la
 40 eficacia de sistemas de administración liposomal, facilitando de este modo la evaluación y la aplicación clínica de terapia génica o tratamiento terapéutico usando liposomas. Los agentes de formación de imágenes pueden utilizar resonancia magnética, fluorescencia o CT/PET como medio de detección. Sin embargo, los obstáculos clave para el uso exitoso de los agentes de formación de imágenes para monitorear el suministro de liposomas son la facilidad de detección, la disponibilidad de la tecnología pertinente y la facilidad y eficiencia de la
 45 administración.

Con respecto al uso de liposomas para administrar agentes de formación de imágenes, las moléculas lipofílicas son generalmente apropiadas, aunque la presente invención no está limitada al uso con dichas moléculas. Sin pretender limitarse por la teoría, los colorantes lipofílicos o colorantes que contienen una fracción lipofílica pueden intercalarse en la membrana liposomal o reconstituirse en el núcleo lipídico de las estructuras
 55 liposomales. Ejemplos de tales colorantes conocidos en la técnica son el colorante de indocarbocianina, Dil. Dil es un colorante fluorescente de carbocianina que se utiliza rutinariamente para marcar las membranas lipídicas. Otros colorantes similares son DiA o DiaO como se describe en Honig, M.G. et al., Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labeling and pathway tracing. Trends Neurosci. 12: 333-335, 340-331, 1989. Otros colorantes lipofílicos que se pueden usar con la presente invención incluyen PKH2, NeuroVue Verde, PKH 26, NeuroVue Rojo y NeuroVue Marrón, según lo descrito por Fritzsche, et al. Diffusion and Imaging properties of
 60 Three New Lipophilic Tracers, NeuroVue Maroon, NeuroVue and NeuroVue Green and their use for Double and Triple Labeling of Neuronal Profile, manuscrito. Cualquiera de estos colorantes puede usarse con la presente invención descrita en el presente documento, ya sea solo o en combinación.

También se utilizan en la técnica y son apropiados para la presente invención agentes de formación de imágenes que tienen dos o más propiedades de formación de imágenes. Tales agentes permiten al investigador o al

médico la posibilidad de utilizar múltiples métodos de formación de imágenes para detectar los agentes administrados de formación de imágenes. Un ejemplo de tales agentes son los denominados colorantes PTIR como lo describen Li, H., et al., MR and Fluorescent Imaging of Low-Density Lipoprotein Receptors, Acad Radiol. 2004; 11: 1251-1259. Estos colorantes contienen tanto un fluoróforo como una fracción de Gd (III) que permiten la detección mediante formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) o microscopía confocal de fluorescencia. La cadena lateral lipofílica facilita la intercalación del colorante en monocapas de fosfolípidos. Por tanto, estos colorantes son apropiados para su uso con sistemas de suministro liposomales tales como el descrito aquí.

La formación de imágenes por RM de protón ofrece las ventajas de ser no invasiva, tomográfica y de alta resolución. En los últimos años, la formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) ha surgido como una herramienta poderosa en los ambientes clínicos, ya que es no invasiva y proporciona una representación precisa del volumen del sujeto. Véase generalmente, la patente de Estados Unidos No. 6.962.686 de Kayyem, et al. titulada Cell-specific gene delivery vehicles. Estas ventajas hacen de la IRM la técnica de elección tanto en la formación de imágenes médicas como una herramienta de formación de imágenes para uso en experimentos biológicos. A diferencia de las técnicas de formación de imágenes de microscopio óptico basadas en el uso de colorantes o fluorocromos, la IRM no produce subproductos tóxicos de fotoblanqueo. Además, a diferencia de la microscopía óptica, la IRM no está limitada por la dispersión de la luz u otras aberraciones ópticas para las células dentro de aproximadamente sólo cien micras de la superficie. Pueden usarse agentes con propiedades de IRM tales como los descritos anteriormente con la presente invención.

El documento US 2003/0095999 A1 divulga un método para suministrar un agente farmacéutico dentro y/o a través de membranas dérmicas y mucosas. El compuesto utilizado incluye una proteína fusogénica asociada con una membrana fosfolipídica. A pesar de las enseñanzas del documento US 2003/0095999 A1, existe una necesidad significativa por agentes no tóxicos que puedan mejorar el suministro o transporte de agentes farmacéuticos o de formación de imágenes a través o por membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica. La presente invención satisface estas necesidades.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para administrar agentes, agentes farmacéuticos o terapéuticos, a través de membranas biológicas, donde el agente está contenido dentro o intercalado en una membrana de fosfolípido y el suministro es facilitado por una proteína de fusión a la membrana. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para mejorar el transporte y el suministro de agentes a través de y/o dentro de las membranas dérmicas y mucosas o la barrera hematoencefálica, donde el agente está contenido dentro de un liposoma y el suministro se facilita usando saposina C, que está asociada con el liposoma.

Como se describe aquí, la presente invención comprende un método para suministrar un agente para formación de imágenes o un agente farmacéutico a través de una membrana biológica, incluyendo la barrera hematoencefálica y las membranas celulares, en donde el método comprende aplicar a la membrana una composición que comprende fosfolípidos aniónicos con o sin fosfolípidos neutros, una cantidad segura y eficaz del agente de formación de imágenes o agente farmacéutico contenido en los fosfolípidos, y una proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la membrana fosfolipídica aniónica es una vesícula. En otra realización, la vesícula es un liposoma. Los liposomas son una forma de nanocontenedor y los nanocontenedores, tales como nanopartículas o liposomas, se usan comúnmente para la encapsulación de fármacos. También se pueden usar fosfolípidos catiónicos, siempre que la carga total del liposoma resultante sea negativa.

En otra realización de la presente invención, el pH de la composición de proteína-lípido es ácido. En otra realización de la presente invención, el pH de la composición está entre aproximadamente 6,8 y 2. En otra realización de la presente invención, el pH de la composición está entre aproximadamente 5,5 y 2. En otra realización, el pH está entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 3,5.

En otra realización, la composición de proteína y lípido se proporciona en forma seca, por ejemplo, un polvo. En otra realización, la forma seca de la composición de proteína y lípido se trata con un ácido. En una realización, el ácido es un regulador ácido o ácido orgánico. En otra realización, el ácido se añade a un nivel suficiente para protonar al menos una porción de la proteína, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5,5 y aproximadamente 2. En otra realización, el ácido se añade a un nivel suficiente para protonar sustancialmente la proteína, en donde la composición tiene un pH de aproximadamente 5,5 y aproximadamente 2.

En una realización adicional, el pH del polvo seco de la composición de proteína y lípido que se ha tratado con suficiente ácido para protonar al menos una porción de la proteína se neutraliza luego sustancialmente. En una realización, el pH se neutraliza con un regulador de pH neutro. En una realización, el pH se neutraliza suficientemente con un regulador de pH neutro para controlar el tamaño del liposoma resultante. En otra realización, el pH se neutraliza suficientemente con un regulador de pH neutro para controlar el tamaño del

liposoma resultante para proporcionar liposomas que tienen diámetros medios de aproximadamente 200 nanómetros. En otra realización, los liposomas tienen un diámetro medio de entre 50 y 350 nanómetros. En otra realización, los liposomas tienen un diámetro medio de entre 150 y 250 nanómetros. En otra realización, el regulador se añade a la composición para proporcionar un pH de la composición final de aproximadamente 5 a aproximadamente 14, preferiblemente de aproximadamente 7 a 14, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 12, más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 10.

En una realización de la presente invención, se usan lípidos de cadena corta. Generalmente, la concentración de la proteína o polipéptido fusogénico es de una cantidad suficiente para suministrar el agente farmacéutico dentro y/o a través de la membrana. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en las membranas *in vitro* está en al menos un exceso de 5 veces con respecto a la proteína o polipéptido fusogénico en relación molar. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en las membranas *in vitro* está en al menos un exceso de 10 veces con respecto a la proteína o polipéptido fusogénico en relación molar. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en las membranas *in vitro* está en por lo menos un exceso de 15 veces con respecto a la proteína o polipéptido fusogénico en relación molar. En una realización, la concentración de fosfolípidos en las membranas *in vitro* está en al menos un exceso de 20 veces con respecto a la proteína o polipéptido fusogénico en relación molar. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en las membranas *in vitro* está en un exceso de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces o aproximadamente 20 a aproximadamente 30 veces de exceso a aquella de la proteína o polipéptido fusogénico en relación molar.

En una realización, la concentración de fosfolípidos en los sistemas *in vivo* o de membrana celular están en al menos un exceso de 1 veces con respecto a aquella del péptido fusogénico en relación molar. En una realización, la concentración de fosfolípidos en sistemas *in vivo* o de membrana celular están en al menos un exceso de 2 veces con respecto a la del péptido fusogénico en relación molar. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en sistemas *in vivo* o de membrana celular están en al menos un exceso de 3 veces con respecto a la del péptido fusogénico en relación molar. En otra realización, la concentración de fosfolípidos en sistemas *in vivo* o de membrana celular están en un exceso de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces o aproximadamente 3 a 7 veces en exceso con respecto a la del péptido fusogénico en relación molar.

Sin desear estar limitado por la teoría de ninguna manera, se cree que la proteína de fusión a la membrana está asociada con la membrana de fosfolípidos, a través de interacciones electrostáticas e hidrófobas y la carga total de la composición de lípidos es negativa.

De acuerdo con la presente invención, las membranas biológicas objetivo incluyen, pero no se limitan a, membranas dérmicas, membranas mucosas, la barrera hematoencefálica y membranas celulares.

Las proteínas de fusión a la membrana preferidas incluyen saposina C, así como otras proteínas, análogos de polipéptidos o polipéptidos derivados de saposina C, SEQ. ID. NO. 1 a 13 y sus mezclas.

En una realización, la proteína de fusión a la membrana comprende al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o más aminoácidos contiguos de una secuencia seleccionada entre saposina C, SEQ. ID. NO. 1 y SEQ. ID. NO. 2. En una realización, la proteína de fusión a la membrana comprende un péptido de la fórmula:

**h-u-Cys-Glu-h-Cys-Glu-h-h-h-Lys-Glu-h-u-Lys-h-h-Asp-Asn-Asn-Lys-u-Glu-Lys-
Glu-h-h-Asp-h-h-Asp-Lys-h-Cys-u-Lys-h-h**

donde h = aminoácidos hidrófobos, incluyendo, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, y

Ala; y donde u = aminoácidos polares no cargados, incluyendo, Thr, Ser, Tyr, Gly, Gln y Asn, y mezclas de los mismos.

En otra realización, la proteína de fusión a la membrana comprende una o más proteínas seleccionadas de otras proteínas, análogos de polipéptidos o polipéptidos derivados de saposina C, SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2, pueden usarse polipéptidos de la fórmula:

**h-u-Cys-Glu-h-Cys-Glu-h-h-h-Lys-Glu-h-u-Lys-h-h-Asp-Asn-Asn-Lys-u-Glu-Lys-
Glu-h-h-Asp-h-h-Asp-Lys-h-Cys-u-Lys-h-h,**

donde h = aminoácidos hidrófobos, incluyendo, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, y

Ala; y donde u = aminoácidos polares no cargados, incluyendo, Thr, Ser, Tyr, Gly, Gln y Asn, y mezclas de los mismos.

En una realización, la proteína de fusión a la membrana comprende al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia: Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro. La proteína de fusión a la membrana comprende al menos 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30 o más aminoácidos contiguos de la secuencia: Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lis Met Cys Ser Lys Leu Pro.

En otra realización, la proteína de fusión a la membrana que comprende la secuencia:

Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro. En otra realización, la proteína de fusión a la membrana que comprende la secuencia: Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro. En otra realización, la proteína de fusión a la membrana es una de 22 mer que comprende la secuencia:

CEFLVKEVTKLIDNNKTEKEIL.

En otra realización, la proteína de fusión a la membrana comprende saposina C. En otra realización, la proteína de fusión a la membrana comprende saposina C en una forma oxidada, acetilada (por ejemplo, formilada y acetilada), acetoacetilada o lactosilada por modificación según métodos conocidos (véase, en particular, JM Shaw, op cit., Basu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3178-3182 (1976), J. Steinbrechert, Biol. Chem. 262, 3703)).

En una realización, las membranas de fosfolípidos son liposomas aniónicos que contienen el agente farmacéutico. En otra realización, los liposomas están hechos de cualquier mezcla de lípidos que contienen lípidos aniónicos de cadena larga. En otra realización, los liposomas están hechos a partir de una mezcla que contiene lípidos aniónicos de cadena larga, lípidos neutros de cadena larga y lípidos neutros de cadena corta, en los que la carga total del liposoma resultante es negativa.

Al seleccionar un lípido para preparar los liposomas usados en la presente invención, se encontrará que una amplia variedad de lípidos es adecuada para su construcción. Particularmente útiles son cualquiera de los materiales o combinaciones de los mismos conocidos por los expertos en la técnica como adecuados para la preparación de liposomas. Los lípidos utilizados pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

En otra realización, los liposomas están hechos a partir de uno o más lípidos biocompatibles. En otra realización, el lípido biocompatible se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos, lisolípidos, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilglicerole, fosfatidilinositole, esfingolípidos, glicolípidos, glucolípidos, sulfatidas, glicoesfingolípidos, ácidos fosfatídicos, ácidos palmíticos, ácidos esteáricos, ácidos araquidónicos, ácidos oleicos, lípidos portadores de polímeros, lípidos portadores de monosacáridos sulfonados, lípidos portadores de disacáridos sulfonados, lípidos portadores de oligosacáridos sulfonados, lípidos portadores de polisacáridos sulfonados, colesteroles, tocoferoles, lípidos con ácidos grasos ligados a éter, lípidos con ácidos grasos ligados a éster, lípidos polimerizados, fosfatos de diacetilo, fosfatos de dicetilo, estearilaminas, cardiolipina, fosfolípidos con ácidos grasos de 6-8 carbonos de longitud, fosfolípidos sintéticos con cadenas acilo asimétricas, ceramidas, lípidos no iónicos, ésteres de ácido esterol alifático, ésteres de esterole de ácidos de azúcares, ésteres de ácidos de azúcar, ésteres de alcoholes de azúcar, ésteres de azúcares, ésteres de ácidos alifáticos, saponinas, dilaurato de glicerol, trilaurate de glicerol, dipalmitato de glicerol, glicerol, ésteres de glicerol, alcoholes de 10-30 carbonos de longitud, 6-(5-colesten-3beta-iloxi)-1-tio-beta-D-galactopiranosido, digalactosildiglicérido, 6-(5-colesten-3beta-iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio-beta-D-galactopiranosido, 6-(5-colesten-3beta-iloxi)hexil-6-amino-6-deoxil-1-tio-alfa-D-manopiranosido, ácido 12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)-octadecanoico, ácido N-[12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoil]-2-aminopalimítico, butanoato de colesteril(4'-trimetilamonio), N-succinildioleoilfosfatidiletanolamina, 1,2-dioleoil-sn-glicerol, 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol, 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol, 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina, palmitoilhomocisteína, lípidos catiónicos, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-dioleoiloxi-3-(trimetilamonio)propano, 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetil-amonio)butanoil-sn-glicerol, lisofosfolípidos, ácido lisobisfosfatídico (LBPA), ácido semi-lisobisfosfatídico (semi-LBPA), cardiolipina, lípidos portadores de polímeros catiónicos, fosfonatos de alquilo, fosfinatos de alquilo y fosfitos de alquilo.

En una realización, la fosfatidilcolina se selecciona del grupo que consiste en dioleoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipentadecanoilfosfatidilcolina, dilaurilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina; en donde la fosfatidiletanolamina se selecciona del grupo que consiste en dipalmitoilfosfatidiletanolamina y dioleoilfosfatidiletanolamina; en donde el esfingolípido es esfingomielina; en donde el glicolípido se selecciona del grupo que consiste en gangliósido GM1 y gangliósido GM2; en donde en

los lípidos que portan polímeros, el polímero se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, quitina, ácido hialurónico y polivinilpirrolidona; en donde los ésteres de ácido alifático de esteroles se seleccionan del grupo que consiste en sulfato de colesterol, butirato de colesterol, isobutirato de colesterol, palmitato de colesterol, estearato de colesterol, acetato de lanosterol, palmitato de ergosterol y n-butirato de fitoesterol; en donde los ésteres de esteroides de ácidos de azúcar se seleccionan del grupo que consiste en glucurónido de colesterol, glucurónido de lanosterol, glucurónido de 7-deshidrocolesterol, glucurónido de ergosterol, gluconato de colesterol, gluconato de lanosterol y gluconato de ergosterol; en donde los ésteres de ácidos de azúcar y los ésteres de alcoholes de azúcar se seleccionan del grupo que consiste en lauril glucurónido, estearoil glucurónido, miristoil glucurónido, lauril gluconato, miristoil gluconato y estearoil gluconato; en donde los ésteres de azúcares y los ésteres de ácidos alifáticos se seleccionan del grupo que consiste en laurato de sacarosa, laurato de fructosa, palmitato de sacarosa, estearato de sacarosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido acárico y ácido poliurónico; en donde las saponinas se seleccionan del grupo que consiste en sarsasapogenina, esmilagenina, hederagenina, ácido oleanólico y digitoxigenina; en donde los ésteres de glicerol se seleccionan del grupo que consiste en tripalmitato de glicerol, diestearato de glicerol, triestearato de glicerol, dimiristato de glicerol, glicerol y trimiristato; en donde los alcoholes tienen una longitud de 10-30 átomos de carbono y se seleccionan del grupo que consiste en alcohol n-decil, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol cetílico y alcohol n-octadecílico; en donde en los lípidos que llevan polímeros catiónicos, los polímeros catiónicos se seleccionan del grupo que consiste en polilisina y poliarginina.

20 En otra realización, el lípido se selecciona del grupo que consiste en dipalmitoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidiletanolamina y ácido dipalmitoilfosfatídico.

25 En otra realización, el agente farmacéutico contenido dentro del liposoma comprende biomoléculas y/o moléculas orgánicas. Esta tecnología puede usarse tanto para aplicaciones cosméticas como medicinales en las que el objetivo es el suministro del agente activo a través de la membrana, tal como la membrana dérmica, mucosa, barrera hematoencefálica o membranas celulares.

30 La presente invención se refiere también a un método de tratamiento de enfermedades mediante el transporte de macromoléculas tales como genes, proteínas y otras moléculas biológicas u orgánicas a través de la barrera hematoencefálica, donde el método comprende la administración de una composición que comprende liposomas aniónicos con o sin lípidos de cadena corta, una cantidad segura y eficaz de un agente terapéutico macromolecular contenido en los liposomas y saposina C.

35 En otras realizaciones, la presente invención presenta composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico pequeña, tal como ácido nucleico pequeño de interferencia (ANpi), un ARN pequeño de interferencia (ARNpi), un ARN bicatenario (ARNbc), un microARN (mARN), o un ARN corto de horquilla (ARNch), mezclado o complejo con, o conjugado a, una membrana o liposoma fusogénico de saposina.

40 La presente invención se refiere también a un método mediante el cual pueden tratarse neuroblastoma, inflamación cerebral, leucodistrofia metacromática (MLD), Niemann-Pick, accidente cerebrovascular, Parkinson, enfermedades de Alzheimer, trastornos de desmielinización, neuropatía retiniana, enfermedad de Huntington, ALS, esclerosis múltiple, neurosis, cáncer de cerebro, trauma cerebral o de la médula espinal, autismo, trastornos del almacenamiento lisosómico, el síndrome de X frágil, las ataxias heredadas y ceguera, en donde el método comprende las etapas de elaborar un sistema de suministro liposómico en el que el liposoma comprende lípidos ácidos de cadena larga, con o sin adición de lípidos neutros de cadena larga y lípidos neutros de cadena corta, y saposina C, prosaposina, así como otras proteínas, análogos de polipéptidos o polipéptidos derivados de saposina C o prosaposina. El liposoma puede contener agentes terapéuticos tales como agentes antiinflamatorios, agentes antiapoptóticos y neuroprotectores, o enzimas, proteínas o los correspondientes genes, secuencias de ADN o ARN para genes identificados como carentes de estas enfermedades.

50 En una realización, se proporcionan composiciones y métodos que comprenden un polinucleótido, o un precursor del mismo, en combinación con membranas o liposomas fosfolípidos aniónicos fusogénicos, una proteína fusogénica o un polipéptido derivado de prosaposina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 En una realización, se proporcionan composiciones y métodos que comprenden un ácido nucleico pequeño de interferencia (ANpi), o un precursor del mismo, en combinación con membranas o liposomas de fosfolípidos aniónicos fusogénicos, una proteína fusogénica o un polipéptido derivado de prosaposina, y un portador farmacéuticamente aceptable. Dentro de las nuevas composiciones de la invención, el ANpi puede mezclarse o complejarse con, o conjugarse con, las membranas o liposomas de fosfolípidos aniónicos fusogénicos con una proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina para formar una composición que mejora el suministro intracelular del ANpi.

60 La presente invención también comprende un método para tratar la enfermedad de Gaucher, en donde el método comprende la administración de una composición que comprende liposomas aniónicos, una cantidad segura y eficaz de beta-glucosidasa ácida contenida dentro de los liposomas; y saposina C, todas ellas contenidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el pH de la composición es de aproximadamente 7, 6,8, 6,5, 6,

5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos y la saposina C se asocia con la superficie del liposoma a través de una interacción electrostática e hidrófoba. Generalmente, la concentración del liposoma es aproximadamente un exceso de 1 a 10 veces el de la saposina C. En una realización, el pH de la composición es menor a aproximadamente 6,8. En otra realización, el pH de la composición es menor a aproximadamente 6,0.

5

En otra realización, el pH de la composición es menor a aproximadamente 5,5. En otra realización, el pH de la composición es menor a aproximadamente 5,0.

10

La presente invención se refiere también a un método para tratar parches de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos bronquiales, en el que el método comprende la administración de una composición que comprende lípidos aniónicos de cadena larga, lípidos neutros de cadena larga y/o lípidos neutros de cadena corta, una cantidad segura y eficaz de lípido, ADN o antígenos de proteínas, saposina C, prosaposina, así como otras proteínas, análogos de polipéptidos o polipéptidos derivados de saposina C o prosaposina.

15

La presente invención también se refiere a un método de formación de imágenes de tejidos y células en el que la composición comprende un liposoma que contiene saposina C y un agente de formación de imágenes detectable seleccionado del grupo que consiste en agentes detectables por IRM, agentes fluorescentes, agentes detectables por CT/PET, agentes que tienen múltiples propiedades de detección, o combinaciones de los mismos. El agente puede intercalarse en la membrana lipídica o encapsularse dentro del liposoma. En otra realización de la presente invención, el complejo liposómico de saposina C puede incorporar uno, dos o tres agentes distintos que tienen diferentes propiedades de formación de imágenes, de tal manera que se pueden usar múltiples métodos distintos de detección con una única administración de liposomas de saposina C.

20

25

Otros agentes auxiliares incluyen fluoróforos (tales como fluoresceína, dansilo, puntos cuánticos y similares) y pueden usarse tintes infrarrojos o metales en formación de imágenes ópticas o de luz (por ejemplo, microscopía confocal y formación de imágenes de fluorescencia).

30

En otra realización, la composición comprende además un radionúclido, un agente quelante, biotina, un fluoróforo, un anticuerpo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, nanopartículas, puntos cuánticos, nanogotitas de agentes anticancerígenos, agentes anticancerosos o agentes quimioterapéuticos, fármacos liposomales, citoquinas o toxinas de moléculas pequeñas unidas a los mismos.

35

En otra realización, la fracción de formación de imágenes se selecciona del grupo que consiste en un radionúclido, biotina, un fluoróforo, un anticuerpo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, nanopartículas, puntos cuánticos, nanogotitas de agentes anticancerosos detectables, fármacos liposomales y citoquinas.

40

Un experto en la materia está familiarizado con métodos para unir radionúclidos, agentes quelantes y conjugados de enlazador-agente quelante a los ligandos de la presente invención. En particular, la unión de radionúclidos, agentes quelantes y conjugados de enlazador-agente quelante a los ligandos de la presente invención se puede llevar a cabo convenientemente usando, por ejemplo, grupos enlazantes bifuncionales comercialmente disponibles (generalmente grupos enlazantes heterobifuncionales) que se pueden unir a un grupo funcional presente en una posición no interferente sobre el compuesto y luego enlazado, por ejemplo, a un radionúclido, un agente quimioterapéutico, un agente anticanceroso, una nanopartícula, un punto cuántico, una nanogotita de un agente anticanceroso o una toxina de molécula pequeña. De esta manera, los compuestos de la presente invención se pueden usar para transportar agentes adecuados a un sitio objetivo, generalmente, un tumor u órgano o tejido que tiene células cancerosas. En otra realización, se prepara un complejo ligando Qdot incubando un ligando biotinilado con estreptavidina-Qdot605 (Quantum Dot Corp., Hayward, CA).

45

50

En una realización de esta invención, el liposoma que contiene un agente de formación de imágenes trazables puede usarse para elegir como blanco tumores tales como neuroblastoma, permitiendo la determinación del tamaño del tumor, crecimiento, localización o metástasis.

55

El resumen anterior de la presente invención no pretende describir cada realización o cada implementación de la presente invención. Las ventajas y logros, junto con una comprensión más completa de la invención, se harán evidentes y apreciados haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones tomadas en conjunto con los dibujos acompañantes.

60

A lo largo de este documento, todas las temperaturas se dan en grados Celsius, y todos los porcentajes son porcentajes en peso a menos que se indique lo contrario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65

Esta invención, tal como se define en las reivindicaciones, se puede comprender mejor con referencia a los siguientes dibujos. Los dibujos no son necesariamente a escala, sino haciendo más bien hincapié en los principios claramente ilustrativos de la presente invención.

Figura 1: Modelo acoplable para la fusión inducida por saposina C: Las saposinas C unidas a liposomas se unen entre sí a través de la interacción hidrofóbica, e inducen la fusión de liposomas.

5 Figura 2: Asociación de vesícula de saposina C y liposoma: Una alteración conformacional del pliegue de saposina C encontrado en saposina C unida a lípido. La interacción topológica de membrana de saposina C indicó que las hélices anfipáticas en los extremos terminales amino y carboxilo estaban incrustadas en la bicapa lipídica y en la región media de la saposina C se expone a la fase acuosa. La región media de la saposina C se expone a la fase acuosa.

10 Figura 3: Figura esquemática de la organización funcional de la activación neuritogénica de la β -glucosidasa ácida y de las propiedades de unión a los lípidos de la saposina C. Excepto para la caja que indica el giro predicho y los enlaces disulfuro, la figura no pretende representar la estructura física conocida. Los residuos de 22-32 son de importancia principal para el efecto neurotrófico. La región que abarca los residuos 42-61 es crítica para los efectos de activación de la β -glucosidasa ácida de la saposina C, y la presencia de los tres enlaces disulfuro también es importante para esta función. Además, se requiere una estructura de orden superior para tener actividades completas de saposina C. Las regiones de interacción de lípido/membrana lipídica están localizadas en ambas regiones de los extremos terminales NH_2 y COOH .

20 Figura 4: Cambios de tamaño de liposomas de BPS (fosfatidilserina cerebral) inducidos por Ca^{2+} (a) o Saposina C (b) a pH 4,7 o 7,4. Función de autocorrelación justa, polvo = 0,0%, error de línea base <1%, temperatura ambiente.

25 Figura 5. Transporte de NBD-DOPS y saposina C en cerebelo de cerebros de ratón. Se administraron proteoliposomas de NBD-DOPS-saposina C (A, C, D) y PBS (B, E, F) a través de venas de la cola de ratones adultos FBV/N. Las secciones de cerebelo congeladas se prepararon a las 48 horas después de la inyección. La fluorescencia verde NBD para detectar DOPS en (A) y (B) se visualizó usando un microscopio (Zeiss Axioskop, 100X). Se formaron imágenes de fluorescencia verde NBD (C y E) y el anticuerpo anti-His (un anticuerpo secundario conjugado con rodamina, fluorescencia roja) para detectar saposina C (D y F) en células de Purkinje bajo un microscopio confocal (LSM510, Zeiss). Barra: 20 μm (C-F). Términos: p = células de Purkinje; g = células granulares.

Figura 6. Espectros de fluorescencia para proteoliposomas PTIR-271 (20 μM) / Saposina C-DOPS en PBS (Figura 7A), y proteoliposomas PTIR-316 (20 μM) / SapC-DOPS en PBS (Figura 7B).

35 Figura 7. Captación de Saposina-C-DOPS que contiene PTIR-271 y PTIR-316 en células de neuroblastoma humano (CHLA-20). Las Figuras 8A y 8B muestran la captación de PTIR-271 como la suministrada por los liposomas SapC-DOPS. Las Figuras 8C y 8D muestran la captación de PTIR-316 en la forma suministrada por los liposomas SapC-DOPS. Los liposomas de control (tratados con liposomas SapC-DOPS sin PTIR-271 o PTIR-316) se muestran en las Figuras 8E y 8F. Las imágenes en rojo representan la absorción de colorantes. La visualización utilizando un microscopio Zeiss Axiovert-ApoTome (lente de aceite 63 X y 40 X); $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}}$; divisor de haz: 660; contraste de fase B/W para la morfología celular. Software Axiovision utilizado para la formación de imágenes.

45 Figura 8. Suministro de ARNpi de GFP22 en células EGFP 4T1 utilizando liposomas SapC-DOPS. ARNpi de GFP22 es un ARN bicatenario de 22 nucleótidos que inhibe específicamente la expresión del gen de la proteína fluorescente verde. (NJ Caplen et al., ANPS, 2001, 98: 9742-9747). El tiempo de incubación fue de 72 horas. 20x, exposición de 800 ms; Photoshop: niveles de entrada 27, 1,19, 164; nivel de salida 255. Tamaño 3X2,29 pulgadas. Las Figuras 9A y 9C representan liposomas que contienen ARNpi de GFP22; las Figuras 9B y 9D representan controles negativos en los que se utilizó un ARNpi no silenciador (que consiste en un fragmento de ARN bicatenario de 22 nucleótidos) que no afecta a la expresión de GFP. Todo el ARN se adquirió de QIAGEN.

Figura 9. Micrografías del suministro de ARNpi de GFP 22 en células cancerosas de neuroblastoma (CHLA-20) que muestran (a) ARNpi de rodamina-GFP22; (b) contraste de fases; y (c) fusionadas.

55 En la siguiente descripción de las realizaciones ilustradas, se hacen referencias a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma, y en los que se muestra a modo de ilustración diversas realizaciones en las que se puede poner en práctica la invención. Debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones, y se pueden efectuar cambios estructurales y funcionales sin apartarse del alcance de la presente invención.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología específica, los dispositivos y las formulaciones como tales, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Debe tenerse en cuenta que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un, uno, una", "y" y "el, la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar en la práctica o pruebas de la invención cualesquiera métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención, se describen a continuación los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Definiciones

Los términos "administrado" y "administración" se refieren generalmente a la administración a un paciente de un material biocompatible, incluyendo, por ejemplo, composiciones de lípidos y/o vesículas y agentes de limpieza.

Por consiguiente, "administrado" y "administración" se refieren, por ejemplo, a la inyección en un vaso sanguíneo de composiciones de lípidos y/o vesículas y/o agentes de limpieza. Los términos "administrado" y "administración" también pueden referirse a la administración de composiciones de lípidos y/o vesículas y/o agentes de limpieza a una región de interés.

Los términos "aminoácido" o "secuencia de aminoácidos", como se usan en la presente memoria, se refieren a una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína, o un fragmento de cualquiera de estos, y a moléculas naturales o sintéticas. Cuando la "secuencia de aminoácidos" se describe aquí para referirse a una secuencia de aminoácidos de una molécula de proteína natural, "secuencia de aminoácidos" y términos similares no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula de proteína mencionada.

El término "lípidos anfipáticos" significa una molécula que tiene un grupo de "cabeza" hidrofílico y un grupo de "cola" hidrófobo y tiene capacidad de formación de membrana.

Como se usa en la presente memoria, los términos "membrana fosfolípida aniónica" y "liposoma aniónico" se refieren a una membrana de fosfolípido o liposoma que contiene componentes lipídicos y tiene una carga negativa total a pH fisiológico.

"Fosfolípidos aniónicos" significa fosfolípidos que tienen carga negativa, incluyendo lípidos a base de fosfato, sulfato y glicerol.

"Agente bioactivo" se refiere a una sustancia que se puede usar en conexión con una aplicación que es de naturaleza terapéutica o diagnóstica, tal como en métodos para diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente y/o en métodos para el tratamiento de la enfermedad en un paciente. Tal como se utiliza en la presente memoria, "agente bioactivo" se refiere también a sustancias que son capaces de ejercer un efecto biológico *in vitro* y/o *in vivo*. Los agentes bioactivos pueden ser neutros o cargados positiva o negativamente. Ejemplos de agentes bioactivos adecuados incluyen agentes de diagnóstico, compuestos farmacéuticos, fármacos, moléculas orgánicas sintéticas, proteínas, péptidos, vitaminas, esteroides y material genético, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

El término "contenido (con) en" se refiere a un agente farmacéutico que está envuelto dentro de una membrana de fosfolípido, de manera que el agente farmacéutico está protegido del entorno exterior. Este término puede usarse indistintamente con "encapsulado".

Una "supresión", como se usa aquí el término, se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que da como resultado la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos.

El término "derivado", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la modificación química de una secuencia polipeptídica, o una secuencia polinucleotídica. Las modificaciones químicas de una secuencia polinucleotídica pueden incluir, por ejemplo, la sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Un polinucleótido derivado codifica un polipéptido que retiene al menos una función biológica de la molécula natural. Un polipéptido derivado es uno modificado, por ejemplo, por glicosilación, o cualquier otro proceso que retenga al menos una función biológica del polipéptido del que se derivó.

Las palabras "inserción" o "adición", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a cambios en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que resulta en la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, a la secuencia encontrada en la molécula de origen natural.

Los términos "lípidos" y "fosfolípidos" se usan indistintamente y se refieren a estructuras que contienen lípidos, fosfolípidos o derivados de los mismos que comprenden una variedad de diferentes disposiciones estructurales que se sabe que los lípidos adoptan en suspensión acuosa. Estas estructuras incluyen, pero no se limitan a, vesículas de bicapa lipídica, micelas, liposomas, emulsiones, vesículas, cintas o láminas lipídicas. En la

realización preferida, el lípido es un liposoma aniónico. Los lípidos se pueden usar solos o en cualquier combinación que un experto en la técnica apreciaría para proporcionar las características deseadas para una aplicación particular. Además, los aspectos técnicos de los constructos de lípidos y la formación de liposomas son bien conocidos en la técnica y cualquiera de los métodos comúnmente practicados en el campo puede ser usado para la presente invención.

"Composición de lípidos" se refiere a una composición que comprende un compuesto lipídico, típicamente en un medio acuoso. Ejemplos de composiciones de lípidos incluyen suspensiones, emulsiones y composiciones de vesículas. "Formulación lipídica" se refiere a una composición lipídica que también comprende un agente bioactivo.

"Liposoma" se refiere a un grupo o agregado generalmente esférico de compuestos anfipáticos, incluyendo compuestos lipídicos, típicamente en forma de una o más capas concéntricas, por ejemplo, bicapas. Pueden también denominarse aquí vesículas lipídicas.

El término "lípido de cadena larga" se refiere a lípidos que tienen una longitud de cadena carbonada de aproximadamente 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24. En una realización, la longitud de la cadena se selecciona de una longitud de cadena de 18, 19 o 20. Ejemplos de lípidos que se pueden usar con la presente invención están disponibles en la página web www.avantilipids.com. Ejemplos representativos de lípidos de cadena larga que pueden usarse con la presente invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes lípidos:

14:0 PS 1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica) (DMPS), 16:0 PS 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica) (DPPS), 17:0 PS 1,2-Diheptadecanoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 18:0 PS 1,2-Distearoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica) (DSPS); 18:1 PS 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica) (DOPS); 18:2 PS 1,2-Dilinoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 20:4 PS 1,2-Diaraquidonoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 22:6 PS 1,2-didocosahexaenoil-sn-glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 16:0-18:1 PS 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica) (POPS); 16:0-18:2 PS 1-Palmitoil-2-Linoleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 16:0-22:6 PS 1-Palmitoil-2-Docosahexaenoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 18:0-18:1 PS 1-Estearoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 18:0-18:2 PS 1-Estearoil-2-Linoleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 18:0-20:4 PS 1-Estearoil-2-Araquidonil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 18:0-22:6 PS 1-Estearoil-2-Docosahexaenoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 16:0 PC 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (DPPC); 17:0 PC 1,2-Diheptadecanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:0 PC 1,2-Diestearoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (DSPC); 16:1 PC (Cis) 1,2-Dipalmitoleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 16:1 Trans PC 1,2-Dipalmitelaidoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:1 PC Delta6 (cis) 1,2-Dipetroselinolil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:2 PC (cis) 1,2-Dilinoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:3 PC (cis) 1,2-Dilinoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 20:1 PC (cis) 1,2-Dieicosenoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 22:1 PC (cis) 1,2-Dierucoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 22:0 PC 1,2-Dibehenoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 24:1 PC (cis) 1,2-Dinervonoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 16:0-18:0 PC 1-Palmitoil-2-Estearoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 16:0-18:1 PC 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 16:0-18:2 PC 1-Palmitoil-2-Linoleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:0-18:1 PC 1-Estearoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:0-18:2 PC 1-Estearoil-2-Linoleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:1-18:0 PC 1-Oleoil-2-Estearoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:1-16:0 PC 1-Oleoil-2-Palmitoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 18:0-20:4 PC 1-Estearoil-2-Araquidonil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 16:0-18:1 PG 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal Sódica) (POPG); 18:1 PG 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal Sódica) (DOPG); 18:1 PA 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal Monosódica) (DOPA); 18:1 PI 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfoinositol (Sal de Amonio); 16:0(D31)-18:1 PI 1-Palmitoil(D31)-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfoinositol (Sal de Amonio); 18:1 PE 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina (DOPE); 18:2 PE 1,2-Dilinoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina.

Las frases "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a un nucleótido, oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento de los mismos. Un "ácido nucleico" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones base-azúcar-fosfato. (Un polinucleótido se distingue de un oligonucleótido por contener más de 120 unidades monoméricas). Los nucleótidos son las unidades monoméricas de polímeros de ácido nucleico. El término incluye ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) en forma de un ARN mensajero oligonucleótido, antisentido, ADN plasmídico, partes de un ADN plasmídico o material genético derivado de un virus. Antisentido es un polinucleótido que interfiere con la función del ADN y/o el ARN. El término ácido nucleico se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. Los ácidos nucleicos naturales tienen una cadena principal de fosfato, los ácidos nucleicos artificiales pueden contener otros tipos de cadenas principales, pero contienen las mismas bases. Los nucleótidos son las unidades monoméricas de los polímeros de ácido nucleico. El término incluye ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). El ARN puede estar en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNpi (ácido ribonucleico pequeño de interferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido y ribozimas. El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden ser de cadena sencilla, doble, triple o cuádruple. El término también incluye ANP (ácidos nucleicos peptídicos), ANpi (ácido nucleico pequeño de interferencia), fosforotioatos y otras variantes de la cadena principal de fosfato de ácidos nucleicos nativos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "agente farmacéutico basado en nucleótidos" o "fármaco basado en nucleótidos" se refiere a un agente farmacéutico o fármaco que comprende un nucleótido, un oligonucleótido o un ácido nucleico.

5 "Paciente" o "sujeto" se refiere a animales, incluyendo mamíferos, preferiblemente seres humanos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "agente farmacéutico o fármaco" se refiere a cualquier material químico o biológico, compuesto o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Algunos fármacos se venden en una forma inactiva que se convierte *in vivo* en un metabolito con actividad farmacéutica. Para los propósitos de la presente invención, los términos "agente farmacéutico" y "fármaco" abarcan tanto el fármaco inactivo como el metabolito activo.

15 La frase "dosis o cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la administración de un agente farmacéutico, el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico y la cantidad exacta del activo depende de la condición física del paciente, la progresión de la enfermedad que está siendo tratada, etc.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "saposina" se refiere a la familia de proteínas y polipéptidos derivados de prosaposina, incluyendo, pero sin limitarse a, saposinas naturales A, B, C y D, así como proteínas y péptidos derivados de saposina sintéticos y análogos de péptidos que muestran actividad fusogénica. La saposina C y los polipéptidos derivados de la misma pueden usarse en una realización de la invención.

25 El término lípido de cadena corta se refiere a lípidos que tienen una longitud de cadena de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 carbonos. En una realización, la longitud de cadena es de 6, 7, 8, 9 o 10 carbonos. En una realización, la longitud de la cadena es 6, 7 u 8 carbonos. Ejemplos de lípidos de cadena corta negativos están disponibles en la página web www.avantilipids.com. Ejemplos de lípidos de cadena corta que pueden usarse con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: 1,2-Dihexanoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 08:0 PS 1,2-Dioctanoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-L-Serina] (Sal Sódica); 03:0 PC 1,2-Dipropionoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 04:0 PC 1,2-Dibutiroil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 05:0 PC 1,2-Divaleroil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 06:0 PC (DHPC) 1,2-Dihexanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 07:0 PC 1,2-Diheptanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 08:0 PC 1,2-Dioctanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 09:0 PC 1,2-Dinonanoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina; 06:0 PG 1,2-Dihexanoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal Sódica); 08:0 PG 1,2-Dioctanoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal Sódica); 06:0 PA 1,2-Dihexanoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal Monosódica); 08:0 PA 1,2-Dioctanoil-sn-Glicero-3-Fosfato (Sal Monosódica); 06:0 PE 1,2-Dihexanoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina; 08:0 PE 1,2-Dioctanoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina.

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico pequeño de interferencia", "ANpi", "ARN pequeño de interferencia", "ARNpi", "molécula de ácido nucleico corta de interferencia", "molécula de oligonucleótido corta de interferencia" o molécula de ácido nucleico corta de interferencia modificada químicamente", se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de inhibir subregular la expresión génica o la replicación viral, por ejemplo mediando el ARN de interferencia "ARNi" o el silenciamiento de genes de una manera específica de la secuencia. Dentro de los ejemplos de las realizaciones, el ANpi es una molécula de polinucleótido bicatenario que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo para subregular la expresión, o una porción de la misma, y una región sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a (es decir, que es sustancialmente idéntica en secuencia a) la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma.

50 "ANpi" significa un ácido nucleico pequeño de interferencia, por ejemplo, un ARNpi, que es un ácido nucleico bicatenario de corta longitud (u opcionalmente un precursor más largo del mismo), y que no es inaceptablemente tóxico en células objetivo. La longitud de los ANpi útiles dentro de la invención se optimizará en ciertas realizaciones a una longitud de aproximadamente 21 a 23 pb de longitud. Sin embargo, no hay ninguna limitación particular en la longitud de los ANpi útiles, incluyendo los ARNpi. Por ejemplo, los ANpi pueden presentarse inicialmente a las células en una forma precursora que es sustancialmente diferente de una forma final o procesada del ANpi que existirá y ejercerá actividad de silenciamiento génico en el momento del suministro, o después del suministro, a la célula objetivo. Las formas precursoras de los ANpi pueden, por ejemplo, incluir elementos de secuencia precursores que se procesan, degradan, alteran o escinden en o después del momento del suministro para producir un ANpi que es activo dentro de la célula para mediar el silenciamiento génico. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los ANpi útiles dentro de la invención tendrán una longitud de precursor, por ejemplo, de aproximadamente 100-200 pares de bases, 50-100 pares de bases o menos de aproximadamente 50 pares de bases, lo que producirá un ANpi activo procesado dentro de la célula objetivo. En otras realizaciones, un precursor de ANpi o ANpi útil será de aproximadamente 10 a 49 pb, de 15 a 35 pb, o de aproximadamente 21 a 30 pb de longitud.

65

"Vesícula" se refiere a una entidad esférica que se caracteriza generalmente por la presencia de una o más paredes o membranas que forman uno o más huecos internos. Las vesículas pueden formularse, por ejemplo, a partir de lípidos, incluyendo los diversos lípidos aquí descritos, materiales proteínicos, materiales poliméricos, incluyendo polímeros naturales, sintéticos y semisintéticos, o tensoactivos. Las vesículas preferidas son aquellas que comprenden paredes o membranas formuladas a partir de lípidos. En estas vesículas preferidas, los lípidos pueden estar en forma de una monocapa o bicapa, y los lípidos monocapa o bicapa pueden usarse para formar una o más mono o bicapas. En el caso de más de una mono o bicapa, las mono o bicapas pueden ser concéntricas. Se pueden usar lípidos para formar una vesícula unilamelar (compuesta por una monocapa o bicapa), una vesícula oligolamelar (compuesta por aproximadamente dos o aproximadamente tres monocapas o bicapas) o una vesícula multilamelar (que comprende más de aproximadamente tres monocapas o bicapas). De forma similar, las vesículas preparadas a partir de proteínas o polímeros pueden comprender una o más paredes o membranas concéntricas. Las paredes o membranas de vesículas preparadas a partir de proteínas o polímeros pueden ser sustancialmente sólidas (uniformes), o pueden ser porosas o semiporosas. Las vesículas descritas en el presente documento incluyen dichas entidades comúnmente denominadas como, por ejemplo, vesículas unidas a liposomas, micelas, burbujas, microburbujas, microesferas, burbujas revestidas de lípidos, polímeros y/o surfactantes, microburbujas y/o microesferas, microbalones, aerogeles, clatratos, y similares. El vacío interno de las vesículas se puede rellenar con un líquido (que incluye, por ejemplo, un líquido acuoso), un gas, un precursor gaseoso y/o un material sólido o soluto, que incluye, por ejemplo, un ligando de direccionamiento y/o un agente bioactivo, según se desee.

Proteínas o polipéptidos fusogénicos

En una realización, la presente invención proporciona membranas fosfolipídicas que comprenden una o más proteínas o polipéptidos fusogénicos lisosómicos. En otra realización, una o más proteínas o polipéptidos fusogénicos lisosómicos están contenidos dentro de los liposomas aniónicos. En otra realización, los liposomas aniónicos comprenden además un agente farmacéutico.

Las proteínas y polipéptidos fusogénicos lisosómicos adecuados para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas de la familia saposina, por ejemplo, saposina C. También se incluyen homólogos de saposina C, en donde el homólogo posee al menos 80% de homología de secuencia, debido a la degeneración del código genético que codifica para saposina C, y análogos de polipéptidos y péptidos que poseen actividad biológica similar a la saposina C.

Ejemplos de péptidos o análogos de péptidos incluyen:

Ser-Asp-Val-Tyr-Cys-Glu-Val-Cys-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Met-Cys-Ser-Lys-Leu-Pro (SEQ. ID. No. 1);
Val-Tyr-Cys-Glu-Val-Cys-Glu-Phe-Leu-Val-Lys-Glu-Val-Thr-Lys-Leu-Ile-Asp-Asn-Asn-Lys-Thr-Glu-Lys-Glu-Ile-Leu-Asp-Ala-Phe-Asp-Lys-Met-Cys-Ser-Lys-Leu-Pro (SEQ. ID. No. 2),

y derivados, análogos, homólogos, fragmentos y mezclas de los mismos.

También se incluyen polipéptidos de la fórmula:

h-u-Cys-Glu-h-Cys-Glu-h-h-h-Lys-Glu-h-u-Lys-h-h-Asp-Asn-Asn-Lys-u-Glu-Lys-Glu-h-h-Asp-h-h-Asp-Lys-h-Cys-u-Lys-h-h,

donde h = aminoácidos hidrófobos, incluyendo, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, y

Ala; y u = aminoácidos polares no cargados, incluyendo, Thr, Ser, Tyr, Gly, Gln y Asn.

Las proteínas y polipéptidos fusogénicos lisosómicos adecuados para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas de la familia de la saposina, preferiblemente saposina C. También se incluyen homólogos de la saposina C, donde el homólogo posee al menos un 80% de homología de secuencia, debido a la

degeneración del código genético que codifica para saposina C, y polipéptidos y análogos de péptidos que poseen actividad biológica similar a la saposina C.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "análogo de péptido" se refiere a un péptido que difiere en la secuencia de aminoácidos del péptido nativo sólo por sustituciones conservadoras de aminoácidos, por ejemplo, sustitución de Leu por Val, o Arg por Lys, o por una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos no conservadoras situadas en posiciones que no destruyen la actividad biológica del péptido (en este caso, la propiedad fusogénica del péptido). Un análogo de péptido, tal como se usa en el presente documento, también puede incluir, como parte o la totalidad de su secuencia, uno o más análogos de aminoácidos, moléculas que imitan la estructura de aminoácidos y/o aminoácidos naturales encontrados en moléculas distintas del péptido o análogos de péptido

15 Por "análogos" se entiende sustituciones o alteraciones en las secuencias de aminoácidos de los péptidos de la invención, cuyas sustituciones o alteraciones no afectan adversamente las propiedades fusogénicas de los péptidos. De este modo, un análogo podría comprender un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a un péptido proporcionado en la presente memoria como las SEQ ID NOs: 1 y 2 y en donde uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos conservadoramente con aminoácidos químicamente similares. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro. Asimismo, la presente invención contempla la sustitución de un residuo polar (hidrofílico) tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, y entre glicina y serina. Adicionalmente, también se contempla la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

25 Membrana fosfolipídica y formación de liposomas

30 Esta invención utiliza una membrana fosfolipídica aniónica para efectuar la fusión de la membrana mediada por saposina para la administración de un agente farmacéutico o de formación de imágenes particulares a través de una membrana dérmica o mucosal o a través de la barrera hematoencefálica u otras membranas celulares. Estas membranas fosfolipídicas aniónicas se usan generalmente para preparar liposomas. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en bicapas lipídicas concéntricas y, como se usa en la presente memoria, se refieren a pequeñas vesículas compuestas de lípidos anfipáticos dispuestos en bicapas esféricas. Estructuralmente, los liposomas varían en tamaño y forma desde tubos largos hasta esferas, con dimensiones desde unos pocos cientos de angstroms a fracciones de un milímetro. Independientemente de la forma general, las bicapas se organizan generalmente como láminas concéntricas cerradas, con una capa acuosa separando cada lamela de su vecino. El tamaño de la vesícula normalmente cae en un intervalo de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30.000 nm de diámetro.

40 La película líquida entre lamelas está usualmente entre aproximadamente 3 y 10 nm. Unas variedades de métodos para preparar diversas formas de liposomas han sido descritas en la literatura periódica y de patentes. Para revisiones específicas e información sobre formulaciones de liposomas, se hace referencia a las revisiones de Pagano y Weinstein (véase Ann. Rev. Biophysic. Bioeng., 7, 435-68 (1978) y Ann. Rev. Biophysic, Bioeng., 9, 467-508 (1980)).

45 En una realización, la membrana fosfolipídica aniónica es una vesícula. En otra realización, la vesícula es un liposoma. Los liposomas son una forma de nanocontenedor y se usan comúnmente nanocontenedores, tales como nanopartículas o liposomas, para la encapsulación de fármacos. Los liposomas preferiblemente tienen diámetros medios de aproximadamente 200 nanómetros. En otra realización, los liposomas tienen un diámetro medio de entre 50 y 350 nanómetros. En otra realización, los liposomas tienen un diámetro medio de entre 150 y 250 nanómetros.

55 El suministro específico de liposomas a un tejido objetivo tal como una masa de células proliferante, tejido neoplásico, tejido inflamatorio, tejido inflamado y tejido infectado se puede lograr seleccionando un tamaño de liposoma apropiado para suministrar un agente terapéutico a dicho tejido objetivo. Por ejemplo, los liposomas con un diámetro medio de 180 nm no pueden acumularse en un tumor sólido; se acumulan liposomas con un diámetro medio de 140 nm en la periferia del mismo tumor sólido y se acumulan liposomas con un diámetro medio de 110 nm en las porciones periféricas y centrales de ese tumor sólido.

60 En relación con realizaciones que implican composiciones de vesículas, el tamaño de las vesículas se puede ajustar para el uso final deseado particular incluyendo, por ejemplo, uso diagnóstico y/o terapéutico. El tamaño de las vesículas puede oscilar preferiblemente entre aproximadamente 30 nanómetros (nm) y aproximadamente 300 micrómetros (μm) de diámetro, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos entre las mismas. Más preferiblemente, las vesículas tienen diámetros de aproximadamente 100 nm hasta aproximadamente 10 μm , siendo aún más preferidos diámetros medios de aproximadamente 200 nm hasta aproximadamente 7 μm . En relación con usos particulares, por ejemplo, el uso intravascular, que incluye imágenes de resonancia magnética de la vasculatura, puede preferirse que las vesículas no sean mayores que

aproximadamente 30 μm de diámetro, siendo preferidas las vesículas más pequeñas, por ejemplo, vesículas de tamaño no mayor de aproximadamente 12 μm de diámetro. En ciertas realizaciones preferidas, el diámetro de las vesículas puede ser de aproximadamente 7 μm o menos, siendo más preferidas las vesículas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 5 μm o menos y aún más preferidas las vesículas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 3 μm o menos.

El tamaño de los liposomas puede ajustarse, si se desea, mediante una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo, agitación, microemulsificación, agitación tipo vórtice, extrusión, filtración, sonicación, homogenización, ciclos repetidos de congelación y descongelación, extrusión a presión a través de poros de tamaño definido, y métodos similares.

Además de, o en lugar de, los compuestos lipídicos, proteínicos y/o poliméricos discutidos anteriormente, las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más materiales estabilizantes.

Ejemplos de tales materiales estabilizantes son, por ejemplo, polímeros biocompatibles. Los materiales estabilizantes se pueden emplear para ayudar de forma deseable en la formación de vesículas y/o para asegurar una encapsulación sustancial de los gases o precursores gaseosos. Incluso para gases relativamente insolubles, no difusibles, tales como perfluoropropano o hexafluoruro de azufre, se pueden obtener composiciones de vesículas mejoradas cuando se utilizan uno o más materiales estabilizantes en la formación del gas y de las vesículas llenas de precursores gaseosos. Estos compuestos pueden ayudar a mejorar la estabilidad e integridad de las vesículas con respecto a su tamaño, forma y/u otros atributos.

Los términos "estable" o "estabilizado", tal como se usan en la presente memoria, significa que las vesículas pueden ser sustancialmente resistentes a degradación, incluyendo, por ejemplo, pérdida de estructura de la vesícula o gas encapsulado o precursor gaseoso, durante un periodo de tiempo útil. Típicamente, las vesículas empleadas en la presente invención tienen una vida útil deseable, reteniendo a menudo al menos aproximadamente 90% en volumen de su estructura original durante un periodo de al menos aproximadamente dos a tres semanas en condiciones ambientales normales. En forma preferida, las vesículas son deseablemente estables durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 1 mes, más preferiblemente de al menos aproximadamente 2 meses, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 6 meses, aún más preferiblemente aproximadamente de dieciocho meses, y aún más preferiblemente de hasta aproximadamente 3 años. Las vesículas descritas en el presente documento, incluyendo gas y vesículas llenas de precursores gaseosos, también pueden ser estables incluso en condiciones adversas, tales como temperaturas y presiones que son superiores o inferiores a las experimentadas en condiciones ambientales normales.

La estabilidad de las vesículas descritas en el presente documento puede atribuirse, al menos en parte, a los materiales a partir de los cuales se fabrican las vesículas, incluyendo, por ejemplo, los lípidos, polímeros y/o proteínas descritos anteriormente, y a menudo no necesarios para emplear materiales estabilizadores adicionales, aunque es opcional y puede ser preferido hacerlo. Dichos materiales estabilizantes adicionales y sus características se describen más completamente a continuación.

Los materiales a partir de los cuales se construyen las vesículas son preferiblemente materiales lipídicos, proteínicos o poliméricos biocompatibles, y de éstos, se prefieren los lípidos biocompatibles. Además, debido a la facilidad de formulación, incluyendo la capacidad de preparar vesículas inmediatamente antes de la administración, estas vesículas pueden fabricarse convenientemente en el sitio.

Los polímeros biocompatibles útiles como materiales estabilizantes para preparar el gas y las vesículas llenas de precursores gaseosos pueden ser de origen natural, semisintético (natural modificado) o sintético. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término polímero denota un compuesto constituido por dos o más unidades monoméricas repetitivas, y preferiblemente 10 o más unidades monoméricas repetitivas. La frase polímero semisintético (o polímero natural modificado), tal como se emplea en la presente memoria, denota un polímero natural que ha sido químicamente modificado de alguna forma. Los ejemplos de polímeros naturales adecuados para su uso en la presente invención incluyen polisacáridos naturales. Tales polisacáridos incluyen, por ejemplo, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos (tales como por ejemplo inulina), levano, fucoidano, carragenano, galatocarolosa, ácido péctico, pectinas, incluyendo amilosa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, dextrano, dextrina, dextrosa, polidextrosa, pustulano, quitina, agarosa, queratano, condroitano, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano, almidón y diversos otros homopolímeros o heteropolímeros naturales tales como los que contienen uno o más de las siguientes aldosas, cetosas, ácidos o aminas: eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, lucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrusosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, manitol, sorbitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico, y derivados de los mismos de origen natural. Por lo tanto, los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina. Los ejemplos polímeros semisintéticos incluyen carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y metoxicelulosa. Los ejemplos de polímeros

sintéticos adecuados para uso en la presente invención incluyen polietilenos (tales como, por ejemplo, polietilenglicol, polioxietileno y tereftalato de polietileno), polipropilenos (tales como, por ejemplo, polipropilenglicol), poliuretanos (tales como, por ejemplo, alcohol polivinílico (PVA), cloruro de vinilo y polivinilpirrolidona), poliamidas que incluyen nilon, poliestireno, ácidos polilácticos, hidrocarburos fluorados, carbonos fluorados (tales como, por ejemplo, politetrafluoroetileno) y polimetilmetacrilato, y derivados de los mismos. Los métodos para la preparación de vesículas que emplean polímeros como compuestos estabilizantes serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, una vez armados con la presente descripción, cuando la presente divulgación se acopla con información conocida en la técnica, tal como aquella descrita y referida en la Patente de Estados Unidos No. 5.205.290, cuyas descripciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

En general, los liposomas utilizados en la presente invención pueden dividirse en tres categorías con base en su tamaño total y la naturaleza de la estructura lamelar (véase New York Academy Sciences Meeting, "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", de diciembre de 1977). Las cuatro clasificaciones incluyen vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares gigantes (GUV). Las SUV y LUV, por definición, tienen sólo una bicapa, mientras que las MLV contienen muchas bicapas concéntricas. Las vesículas unilamelares esféricas (ULV) con una polidispersidad baja pueden formarse espontáneamente en mezclas de fosfolípidos cargados. La formación de tales ULV de baja polidispersidad normalmente requiere un proceso de aumento abrupto de temperatura o dilución repentina. En algunos casos, se ha examinado las ULV de baja polidispersidad espontánea son altamente estables a lo largo del tiempo y tras la dilución, que ilustra un gran potencial para encapsular portadores para la administración de fármacos o terapia génica. Véase Nieh, et al. Low-Polydispersity Phospholipid Unilamellar Ellipsoidal Vesicles and Their Interaction with Helical Domains of Saposin C., manuscrito.

Los liposomas presentan una amplia variedad de características, dependiendo de su tamaño, composición y carga. Por ejemplo, los liposomas que tienen un pequeño porcentaje de lípidos insaturados tienden a ser ligeramente más permeables, mientras que los liposomas que incorporan colesterol u otros esteroides tienden a ser más rígidos y menos permeables. Los liposomas pueden tener carga positiva, negativa o neutra, dependiendo del grupo hidrofílico. Por ejemplo, los lípidos con base en colina imparten una carga neutra total, los lípidos con base en fosfato y sulfato contribuyen con una carga negativa, los lípidos con base en glicerol generalmente están cargados negativamente y los esteroides son generalmente neutros en solución, pero tienen grupos cargados. Los lípidos utilizados en la presente invención son lípidos aniónicos y neutros.

Se dispone de una amplia variedad de métodos en relación con la preparación de composiciones de liposomas. Por consiguiente, los liposomas pueden prepararse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas preparatorias liposómicas convencionales que serán evidentes para los expertos en la técnica. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, diálisis con disolventes, prensa francesa, extrusión (con o sin congelación-descongelación), evaporación en fase inversa, congelación-descongelación simple, sonicación, diálisis de quelatos, homogeneización, infusión de disolvente, microemulsificación, formación espontánea, evaporación de disolvente, diálisis con disolvente, técnica de células con prensa francesa, diálisis controlada con detergente, y otras, que involucran cada una la preparación de las vesículas de diversas formas. Véase, por ejemplo, Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990 53, 37-46, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las técnicas de congelación-descongelación adecuadas se describen, por ejemplo, en la solicitud internacional No. PCT/US89/05040, presentada el 8 de noviembre de 1989, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Se prefieren métodos que implican técnicas de congelación-descongelación en relación con la preparación de liposomas. La preparación de los liposomas puede llevarse a cabo en una solución, tal como una solución salina acuosa, una solución reguladora acuosa de fosfato o agua estéril. Los liposomas también pueden prepararse por diversos procedimientos que implican agitación o agitación tipo vórtice. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el uso de un dispositivo mecánico de agitación, tal como un Wig-L-Bug (Crescent Dental, Lyons, Ill), un Mixomat, vendido por Degussa AG, Frankfurt, Alemania, un Capmix, vendido por Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay Alemania, un Silamat Plus, vendido por Vivadent, Lechtenstein, o un Vibros, vendido por Quayle Dental, Sussex, Inglaterra. También se puede usar un equipo de microemulsificación convencional, tal como un Microfluidizador (Microfluidics, Woburn, Mass.).

El secado por aspersión también se puede emplear para preparar las vesículas. Utilizando este procedimiento, los lípidos se pueden mezclar previamente en un medio acuoso y después secarse por aspersión para producir vesículas llenas de gas. Las vesículas pueden almacenarse bajo un espacio de cabeza de un gas deseado.

Muchas técnicas preparatorias liposómicas que pueden adaptarse para su uso en la preparación de composiciones de vesículas se discuten, por ejemplo, en la Patente estadounidense No. 4.728.578; la solicitud de patente de RU GB 2193095 A; Patente estadounidense No. 4.728.575; Patente estadounidense No. 4.737.323; La solicitud Internacional No. PCT/US85/01161; Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 858, páginas. 161-168 (1986); Hope et al., Biochimica et Biophysica Acta, vol. 812, páginas 55-65 (1985); Patente estadounidense No. 4.533.254; Mayhew et al., Methods in Enzymology, vol. 149, páginas 64-77 (1987); Mayhew

et al., *Biochimica y Biophysica Acta*, Vol. 755, páginas 169-74 (1984); Cheng et al., *Investigative Radiology*, vol. 22, páginas 47-55 (1987); Solicitud Internacional No. PCT/US89/05040; Patente estadounidense No. 4.162.282; Patente estadounidense No. 4.310.505; Patente estadounidense No. 4.921.706; y Liposome Technology, Gregoriadis, G., ed., Vol. I, páginas 29-31, 51-67 y 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1984).

Alternativamente, se pueden incluir en la formulación de las composiciones uno o más agentes antibacterianos y/o conservantes, tales como benzoato de sodio, sales de amonio cuaternario, azida de sodio, metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, clorobutanol, ácido deshidroacético, etilendiamina, monotioglicerol, benzoato de potasio, metabisulfito de potasio, sorbato de potasio, bisulfito de sodio, dióxido de azufre y sales inorgánicas de mercurio. Tal esterilización, que también se puede conseguir por otros medios convencionales, tal como por irradiación, será necesaria cuando las vesículas estabilizadas se usen para formación de imágenes bajo circunstancias invasivas, por ejemplo, en forma intravascular o intraperitoneal. Los medios adecuados de esterilización serán evidentes para el experto con base en la presente divulgación.

Al igual que con la preparación de composiciones de lípidos y/o vesículas, están disponibles una amplia variedad de técnicas para la preparación de formulaciones de lípidos. Por ejemplo, las formulaciones de lípidos y/o vesículas pueden prepararse a partir de una mezcla de compuestos lipídicos, proteínas y agentes bioactivos. En este caso, las composiciones lipídicas se preparan como se ha descrito anteriormente en donde las composiciones también comprenden un agente bioactivo. Así, por ejemplo, se pueden preparar micelas en presencia de un agente bioactivo.

Como reconocerán los expertos en la técnica, cualquiera de las composiciones de lípidos y/o vesículas y/o formulaciones de lípidos y/o vesículas se pueden liofilizar para almacenamiento y reconstituirse, por ejemplo, con un medio acuoso (tal como agua estéril, solución regulada de fosfato o solución salina acuosa), con la ayuda de agitación vigorosa. Para evitar la aglutinación o fusión de los lípidos y/o vesículas como resultado de la liofilización, puede ser útil incluir aditivos que eviten que se produzca dicha fusión o aglutinación. Los aditivos que pueden ser útiles incluyen sorbitol, manitol, cloruro de sodio, glucosa, trehalosa, polivinilpirrolidona y poli(etilenglicol) (PEG), por ejemplo, PEG 400. Estos y otros aditivos se describen en la literatura, tal como en la Farmacopea de EE.UU. USP XXII, NF XVII, Farmacopea de los Estados Unidos, National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md. 20852, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Las preparaciones liofilizadas tienen generalmente la ventaja de una mayor vida útil.

En general, las mezclas de lípidos de la presente invención están compuestas de lípidos aniónicos de cadena larga. En una realización, la mezcla lipídica usada para sintetizar liposomas que contienen saposina C comprende 1) lípidos aniónicos de cadena larga, 2) lípidos neutros de cadena larga, y 3) lípidos de cadena corta. Los lípidos de cadena corta pueden ser neutros o aniónicos. En otra realización, la mezcla de lípidos está compuesta solamente de lípidos aniónicos de cadena larga y lípidos de cadena corta neutros o aniónicos. La siguiente tabla ilustra ejemplos de combinaciones de fosfolípidos que pueden usarse para sintetizar liposomas que contienen saposina C de tal manera que se alcancen los objetivos de la presente invención. La saposina C o un polipéptido de Saposina C se puede añadir a las siguientes combinaciones de lípidos usando los métodos descritos en la presente memoria. La Tabla 1 siguiente ilustra combinaciones de fosfolípidos que pueden usarse para poner en práctica la presente invención. Los ejemplos no son exhaustivos, sino que pretenden ilustrar posibles realizaciones de la presente invención.

TABLA 1

Tabla 1. Combinaciones de fosfolípidos de cadena corta y cadena larga que pueden ser usados en combinación con Saposina C o polipéptidos de Saposina C para formar Liposomas que contienen proteínas fusogénicas de acuerdo con la presente invención

Fosfolípido de cadena larga		Fosfolípido de cadena corta
18:1 PS	18:0 PC	06:0 PC (DHPC)
18:1 PS		06:0 PC (DHPC)
18:1 PS	18:0 PC	06:0 PS (DHPS)
18:1 PS		06:0 PS (DHPS)
18:2 PS	18:1 PG	06:0 PS (DHPS)
18:0-18:1 PS	18:1 PE	06:0 PC (DHPC)
16:0 PS	16:1 PC	05:0 PC
20:4 PS	20:1 PC	07:0 PC

Se ha observado que la presencia de la proteína saposina C en el complejo liposomal desestabiliza y reestructura la membrana liposomal, dando como resultado una vida útil limitada para sistemas de administración liposómicos que utilizan esta proteína. Véase Mu-Ping Nieh et al., *Low-Polydispersity Phospholipid Unilamellar Ellipsoidal Vesicles and Their Interaction with Helical Domains of Saposin C*; 2005. La presente invención aborda

este problema. Una realización de la presente invención incluye el uso de al menos un tipo de lípido de cadena corta. La adición de un lípido de cadena corta da como resultado la estabilización de la membrana y un aumento en la vida útil de los liposomas, incrementando la utilidad y la disponibilidad de compuestos terapéuticos con base en liposomas.

5 Un ejemplo de una mezcla de lípidos usada para sintetizar liposomas de saposina-C es aquella que incluye la dioleoilfosfatidilserina lipídica cargada negativamente (DOPS) en donde se añade una pequeña cantidad del lípido neutro de cadena larga dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y el lípido neutro de cadena corta dihexanoil fosfatidilcolina (DHPC). Véase, por ejemplo, Nieh et al., Low-Polydispersity Phospholipid Unilamellar Elipsoidal Vesicles and Their Interaction with Helical Domains of Saposin C, manuscrito. Puede usarse cualquier lípido conocido en la técnica correspondiente en carga y longitud. Las muestras que contienen esta composición de lípidos dopados con una pequeña cantidad de saposina C no se desestabilizan, pero grandes agregados pueden precipitarse fuera de la solución para el sistema con una mayor concentración de saposina C, lo que indica desestabilización de la membrana. Las muestras de DOPS/DPPC/DHPC son estables durante un período de 24 meses, lo que indica que la adición de los lípidos neutros de cadena larga y los lípidos de cadena corta aumentan la estabilidad de los agregados. Sin embargo, se puede usar cualquier combinación de lípidos de cadena larga y corta de acuerdo con la invención tal como se describe en la presente memoria.

Los lípidos de cadena larga negativos de la presente invención pueden ser cualquier fosfolípido de cadena larga que tenga una cadena de carbono de aproximadamente 14 a aproximadamente 24 carbonos de longitud, o de aproximadamente 18 a aproximadamente 20 carbonos de longitud. Una lista exhaustiva de los lípidos está disponible en www.avantilipids.com. Un experto en la técnica se dará cuenta que lípidos pueden usarse en la presente invención. Aunque puede usarse cualquier combinación de lípidos de cadena larga y corta, algunas combinaciones producen liposomas más estables. Por ejemplo, aunque no se pretende limitar la presente invención, lo siguiente puede guiar la selección de la composición a partir de la cual se forman los liposomas: cuando se utilizan cadenas largas de aproximadamente 20 a aproximadamente 24 carbonos de longitud, los lípidos de cadena corta que tienen longitudes de aproximadamente 6 a 8 se pueden usar para mejorar la estabilidad de los liposomas. Cuando se utilizan longitudes de cadena larga de aproximadamente 14 hasta aproximadamente 18, se pueden usar lípidos de cadena corta que tengan longitudes de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7 para mejorar la estabilidad de los liposomas. Aunque estas combinaciones de lípidos producen liposomas más estables, pueden utilizarse con éxito otras combinaciones, y no se pretende que sean rechazadas. La Tabla 2 ilustra ejemplos de combinaciones de fosfolípidos que pueden usarse para generar liposomas más estables. Sin embargo, estos ejemplos no implican que otras combinaciones de fosfolípidos no se puedan usar con la presente invención.

TABLA 2

Tabla 2. Ejemplos de combinaciones de fosfolípidos de cadena corta y larga que pueden ser usados con la presente invención, con base en la longitud de cadena del fosfolípido. La presente invención no está limitada a las siguientes combinaciones.

Longitud del fosfolípido de cadena larga (Número de carbonos)	Longitud del fosfolípido de cadena corta (Número de carbonos)
14 a 24	4 a 8
16 a 22	5 a 7
18 a 20	6 a 7
20 a 24	7 a 8
14 a 18	4 a 6

Además, la presencia o ausencia de hidrocarburos saturados sobre la cadena lipídica afecta la estabilidad de los liposomas. Por ejemplo, se usan lípidos que tienen longitudes de cadena de aproximadamente 18 o más, el fosfolípido puede estar saturado o insaturado, preferiblemente insaturado. Para lípidos más cortos de cadena larga tales como los que tienen de aproximadamente 14 hasta aproximadamente 16 carbonos, el lípido puede ser insaturado, pero el uso de lípidos saturados proporciona un rendimiento mejorado de la presente invención.

Ejemplos de relaciones lipídicas apropiadas son las siguientes. La relación molar del fosfolípido neutro seleccionado con respecto al fosfolípido negativo seleccionado en la composición es de aproximadamente 1 a 10 (aproximadamente 10% de fosfolípidos neutros), o aproximadamente 1 a 5 (aproximadamente 20% de fosfolípidos neutros), o aproximadamente 1 a 1 (50% de fosfolípidos neutros). La relación molar del fosfolípido de cadena larga seleccionado con respecto al lípido de cadena corta seleccionado en la composición es de aproximadamente 4 a 1 (aproximadamente 20% de cadena corta), y puede ser de aproximadamente 10 a 1 (10% de cadena corta) hasta aproximadamente 3 a 1 (aproximadamente 33% de cadena corta). Un ejemplo de la relación de cadena larga con respecto a cadena corta en una realización es como sigue: ([lípido de cadena larga neutro] + [lípido de cadena larga ácido])/[lípido de cadena corta neutro] es aproximadamente de 4. Como otro ejemplo, en una realización, la relación molar de DOPS con respecto a DPPC en la mezcla oscila entre aproximadamente 10-8 a 1, o aproximadamente 7-6 a 1, o aproximadamente 5-3 a 1 o aproximadamente 1-2 a 1,

con $([DPPC] + [DOPS])/DHPC =$ aproximadamente 4. Los lípidos apropiados para uso en la presente invención pueden seleccionarse entre cualquier lípido conocido en la técnica o como se proporciona en www.avantlipids.com.

5 TABLA 3

Tabla 3. Radios hidrodinámicos (nm) a partir de datos de DLS de agregados DOPS/DPPC/DHPC en solución, donde $([DOPS] + [DPPC])/DHPC = 4$. Sólo la muestra con DOPS/DPPC = 10 muestra una distribución bimodal.

Relación DOPS/DPPC	Duración (Día)	R _H nm (%)		
		1-100	100-200	400-800
1	1	40 (79)	145 (12)	441 (9)
1	40	42 (76)	173 (7)	705 (17)
5	1	29 (78)	157 (11)	570(11)
5	40	Ninguno	147 (51)	689 (49)
10	1	Ninguno	138 (70)	582 (30)
10	40	Ninguno	178 (56)	746 (44)
10	240	Ninguno	161 (49)	452 (51)
10	365	Ninguno	159 (51)	471 (49)

10 Para que muchos fármacos tengan potencial terapéutico, es necesario que sean suministrados en el sitio apropiado en el cuerpo, y los fármacos deben tener la capacidad de acceder a los tejidos necesarios. Los liposomas pueden formar la base para la liberación sostenida de fármacos y su administración a tipos de células específicas o partes del cuerpo. El uso terapéutico de liposomas incluye también la administración de fármacos que son normalmente tóxicos en forma libre. En forma liposómica, el fármaco tóxico está ocluido, y puede dirigirse lejos de los tejidos sensibles a ese fármaco y dirigirse a áreas seleccionadas. Los liposomas también pueden usarse terapéuticamente para liberar fármacos durante un período prolongado de tiempo, reduciendo la frecuencia de administración. Además, los liposomas también pueden proporcionar un método para formar dispersiones acuosas de fármacos hidrófobos o anfifílicos, que normalmente no son adecuados para administración intravenosa.

20 Los liposomas de la presente invención pueden comprender uno o más agentes farmacéuticos y/o agentes de formación de imágenes que han sido atrapados en el interior acuoso o entre bicapas o atrapando moléculas hidrófobas dentro de la bicapa. Se pueden emplear varias técnicas para usar liposomas para dirigir fármacos encapsulados a tejidos huésped seleccionados, y alejarse de tejidos sensibles. Estas técnicas incluyen manipular el tamaño de los liposomas, su carga superficial neta y su ruta de administración.

25 Los liposomas de la presente invención también pueden administrarse mediante una vía de administración pasiva. La administración pasiva de liposomas implica el uso de diversas vías de administración, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. Cada ruta produce diferencias en la localización de los liposomas.

30 Los liposomas de la presente invención son también ideales para el suministro de agentes terapéuticos o de formación de imágenes a través de la barrera hematoencefálica. La presente invención se refiere a un método mediante el cual se pueden usar liposomas que contienen agentes terapéuticos para administrar estos agentes al SNC, en donde el agente está contenido dentro de un liposoma compuesto por los lípidos anteriormente mencionados y la saposina C, prosaposina o una variante de saposina. El liposoma que contiene un agente terapéutico puede administrarse por inyección intravenosa, inyección IM, administración transnasal o cualquier otro método de administración de fármaco transvascular, usando métodos generalmente aceptados en la técnica.

40 Sin pretender estar limitado por la teoría, un posible mecanismo de cómo ocurre la fusión a la membrana mediada por la saposina es a través de cambios conformacionales de la proteína. De las proteínas derivadas de pro saposina, la saposina A y la saposina C muestran el mayor grado de identidad/similitud de aminoácidos. Computacionalmente, se predice que ambas proteínas se pliegan en motivos de haces helicoidales anfipáticos.

45 En general, el pliegue de saposina es una súper estructura secundaria común con cinco hélices α anfipáticas plegadas en un solo dominio globular y es común a ambas proteínas. En una realización, el plegado es a lo largo de una hélice localizada en forma central en el extremo terminal amino, contra el cual se empaquetan las hélices 2 y 3 de un lado y las hélices 4 y 5 del otro lado. Este plegado puede proporcionar una interfaz para la interacción de la membrana.

50 Se cree que un mecanismo para la fusión de membrana mediada por saposina con membranas de fosfolípidos aniónicos es un proceso de dos etapas. En la primera etapa, las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente (forma básica), lisina (Lys) y arginina (Arg), de las saposinas y la membrana fosfolipídica cargada negativamente da lugar a una asociación entre estas dos especies (véase la Figura 1). En la segunda etapa, las interacciones hidrófobas intramoleculares entre las hélices de dos proteínas

55

de saposina adyacentes coloca a las dos membranas a una proximidad suficiente para que se produzca la fusión de las membranas (véase la Figura 2).

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la asociación de saposinas, y en particular saposina C, con un lípido requiere generalmente un intervalo de pH de aproximadamente 5,5 o menos, ya que la asociación inicial de saposina C con la membrana surge a través de una interacción electrostática de los residuos de aminoácidos básicos cargados positivamente de saposina C con la membrana aniónica. Por lo tanto, es altamente deseable tener los aminoácidos básicos existentes en sus formas protonadas con el fin de alcanzar un alto número de interacciones electrostáticas.

Alternativamente, las proteínas de fusión relacionadas y los péptidos derivados de la familia de proteínas de la saposina pueden no tener esta limitación de rango de pH inferior y así el rango de pH de otras proteínas de fusión a la membrana y péptidos puede variar desde pH fisiológico (pH de aproximadamente 7) hasta intervalos de pH menores.

Agentes bioactivos

De acuerdo con la presente invención, los agentes bioactivos, por ejemplo, agentes farmacéuticos, están contenidos dentro de la membrana fosfolípida aniónica o el liposoma para el transporte mediado por saposina dentro y/o por debajo de las membranas dérmica y mucosa o a través de la barrera hematoencefálica u otras membranas celulares. Los agentes activos pueden ser grandes biomoléculas incluyendo, pero sin limitarse a, lípidos, en particular ceramidas, esteroides, ácidos grasos, triacilgliceroles, genes y proteínas, ADN, ARN o ARNpi. El agente activo también puede comprender moléculas orgánicas pequeñas. Como se usa en la presente memoria, "agente farmacéutico" significa cualquier material o mezcla de materiales que proporcionan un beneficio cosmético o terapéutico cuando se administra a través de liposomas de saposina C.

Ejemplos de agentes bioactivos o fármacos que pueden ser suministrados por el sistema de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, analgésicos, anestésicos, antifúngicos, antibióticos, antiinflamatorios, antihelmínticos, antídotos, antieméticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antipalúdicos, antimicrobianos, antipsicóticos, antipiréticos, antisépticos, antiartríticos, antituberculosos, antitusivos, antivirales, fármacos cardioactivos, catárticos, agentes quimioterapéuticos, corticoides (esteroides), antidepresivos, depresivos, auxiliares diagnósticos, diuréticos, enzimas, expectorantes, hormonas, hipnóticos, minerales, suplementos nutricionales, parasimpaticomiméticos, suplementos de potasio, sedantes, sulfonamidas, estimulantes, simpaticomiméticos, tranquilizantes, antiinfecciosos urinarios, vasoconstrictores, vasodilatadores, vitaminas, derivados de xantina y similares.

Fármacos digitales

Ejemplos preferidos de agentes farmacéuticos incluyen los fármacos digitales, tales como digoxina, digitoxina, digoxigenina y digitoxigenina. Estos fármacos se utilizan principalmente como agentes cardiacos.

Compuestos Esteroides

Los compuestos esteroideos forman otra clase preferida de agente farmacéutico. Un ejemplo de un agente farmacéutico esteroideo es testosterona (17 beta-hidroxiandrost-4-en-3-ona), el esteroide masculino principal. Su uso terapéutico principal está en el tratamiento de la deficiencia de la función endocrina de los testículos. El estradiol (estra-1,3,5(10)-trieno-3,17beta-diol) es también un agente farmacéutico esteroideo preferido. El estradiol y sus derivados éster están indicados para el tratamiento de los síntomas de la menopausia y otras afecciones que causan una deficiencia de la producción endógena de estrógenos. La progesterona es también un agente farmacéutico esteroideo preferido. La progesterona se utiliza principalmente para suprimir o sincronizar el celo, así como para controlar el aborto habitual y diagnosticar y tratar trastornos menstruales. Otros agentes farmacéuticos esteroideos preferidos incluyen 3-hidroxi-5 alfa-pregnan-20-ona, 3-beta-hidroxi-pregnan-5-eno-20-ona y compuestos relacionados.

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID)

Ejemplos de NSAID incluyen piroxicam (1,1-dióxido de 4-hidroxi-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazin-3-carboxamida), diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno, meperidina, propoxifeno, nalbufina, pentazocina, buprenorfina, aspirina, indometacina, diflunisal, acetaminofén, naproxeno, fenoprofeno, piroxicam, sulindac, tolmetina, meclofenamato, zomepirac, penicilamina, fenilbutazona, oxifenbutazona, cloroquina, hidroxiclороquina, azatiaprina, ciclofosfamida, levamisol, prednisona, prednisolona, betametasona, triamcinolona y metilprednisolona e indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-acético).

Fármacos con base en aminoácidos

Los fármacos con base en proteínas y péptidos, así como otros fármacos basados en aminoácidos, también se pueden usar como agentes farmacéuticos de acuerdo con la presente invención. Los problemas asociados con las estrategias de suministro convencionales para fármacos de proteínas y péptidos son ampliamente apreciados. La administración oral de estos fármacos es generalmente poco práctica debido a la degradación y la no absorción en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la vía parenteral sigue siendo la vía principal de administración.

Los fármacos con base en aminoácidos, tales como las cefalosporinas, tendrán típicamente un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000, y preferiblemente, inferior a aproximadamente 2.500 y, más preferiblemente, menor que aproximadamente 1.000. Los fármacos de proteínas y péptidos tienen típicamente un peso molecular de al menos aproximadamente 100 daltons, y más típicamente un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 a 40.000 daltons. Ejemplos de péptidos y proteínas en este intervalo de tamaños incluyen, pero sin limitarse a, hormona liberadora de la hormona luteinizante, somatostatina, bradiquinina, goserelina, somatotropina, busarelina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, triptorelina, gonadorelina, asparaginasa, nafarelina, sulfato de bleomicina, leuprolida, quimopapaina, factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea (PTH), colecistoquinina, gonadotropina coriónica, insulina, corticotropina (ACTH), calcitonina eritropoyetina, glucagón, hialuronidasa, interferones, por ejemplo alfa, interleuquinas, por ejemplo, IL-1 hormona liberadora de tiotropina, hormonas de la pituitaria (por ejemplo, urofolitropina (folículo hGH, hMG, hCG, FSH, etc.), hormona estimulante de melanocitos, hormona liberadora de gonadotropina, oxitocina, vasopresina, estreptoquinasa, activador del plasminógeno tisular, antagonistas de angiotensina ii, antagonistas de bradiquinina, potenciador C de bradiquinina, encefalinas, factores de crecimiento similares a insulina, antagonistas de prostaglandina, factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento epidérmico (fce), amilina, lipotropina y hormona estimulante del tiroides.

Un ejemplo de un agente farmacéutico peptídico preferido es la hormona paratiroidea (PTH) (véase Harper et al., Eds., Review of Physiological Chemistry, 16ª Ed., Lange Medical Publications, Los Altos, California (1977) pág. 468). También se ha aislado un fragmento que consta de aproximadamente 34 residuos de aminoácidos del extremo terminal N y se ha encontrado que muestra actividad biológica completa de PTH (véase Potts et al., En Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin (Calcitonin), RV Talmage, et al., Eds. Excerpta Medica, Nueva York (1968)). La secuencia del polipéptido varía ligeramente entre las especies de mamíferos. De acuerdo con la presente invención, se entiende que la PTH incluye la hormona paratiroidea humana, así como las otras variantes y el fragmento de 34 aminoácidos. PTH sirve como un factor regulador en el control homeostático del metabolismo del calcio y fosfato (véase, por ejemplo, Parsons, et al., "Physiology and Chemistry of Parathyroid Hormone" en Clinics in Endocrinology and Metabolism, I. MacIntyre, Ed. Saunders, Filadelfia 1972) páginas 33-78). El principal uso terapéutico de la PTH es el tratamiento de la osteoporosis. La PTH también se ha utilizado como regulador del calcio en la sangre.

En una realización, la calcitonina es también un agente farmacéutico peptídico preferido. La calcitonina es un polipéptido que contiene 32 residuos de aminoácidos (véase Harper et al., Editores., Review of Physiological Chemistry, 16ª Edición, Lange Medical Publications, Los Altos, California (1977), página 469). De acuerdo con la presente invención, se entiende que la calcitonina incluye toda la calcitonina, incluyendo aquella de humanos, mamíferos y peces, así como otras variantes. La calcitonina es una hormona reguladora del calcio y se ha utilizado en el tratamiento de la osteoporosis, la hipercalcemia y la enfermedad de Paget.

Un fármaco proteico preferido adicional es la citoquina IL-10. La IL-10 es producida por el subconjunto auxiliar TH2, subconjuntos de células B y monocitos activados por los LP. IL-10 inhibe varias funciones inmunitarias que son relevantes para la respuesta inmune de la piel y, por lo tanto, el desarrollo de la irritación e inflamación que a veces está asociada con la administración transdérmica de fármacos. Más específicamente, la liberación de IFN-alfa, que inicia la cascada de activación celular que conduce a la respuesta inmune de la piel, es inhibida por IL-10. La IL-10 suprime también la síntesis de numerosas citoquinas proinflamatorias mediante los macrófagos, así como la proliferación de células T específicas de antígeno por subregulación de la expresión de MHC clase II.

Fármacos con base en ácidos nucleicos

Generalmente, los fármacos con base en ácido nucleico han tenido un éxito limitado como agentes terapéuticos, en parte, debido a problemas asociados con su estabilidad y suministro. Los agentes farmacéuticos con base en nucleótidos con frecuencia contienen un enlace fosfodiéster que es sensible a la degradación por nucleasas.

Dicha degradación sería un impedimento significativo para el uso de un oligonucleótido o ácido nucleico como un agente farmacéutico que depende de la integridad de la secuencia para su especificidad de reconocimiento. Por lo tanto, los oligonucleótidos y ácidos nucleicos que se producen naturalmente deben a menudo modificarse químicamente para hacerlos resistentes a nucleasas que los degradarían *in vivo* o incluso *in vitro* a menos que se tome el cuidado de elegir condiciones apropiadas. Sin embargo, esto no es necesario usando el sistema de administración de fármacos de la presente invención.

Los fármacos con base en nucleótidos de la presente invención incluyen aptámeros, compuestos antisentido y fármacos de triple hélice. Los fármacos con base en nucleótidos típicamente tendrán un peso molecular aproximadamente mayor a 350 y pueden extenderse hasta aproximadamente 100 bases. Ejemplos de fármacos mayor que en nucleótidos incluyen di y trinucleótidos, tales como GS 375, un análogo de dinucleótido con actividad terapéutica potencial contra el virus de la influenza (Gilead Sciences, Inc., Foster City, CA).

En una realización, el fármaco mayor que en nucleótidos comprende uno o más genes terapéuticos. El gen terapéutico que está encapsulado dentro del liposoma puede ser cualquiera de los genes terapéuticos comunes que se usan para expresar agentes terapéuticos y de diagnóstico. Ejemplos de genes terapéuticos incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares o traumatismos cerebrales; tirosina hidroxilasa y/o aminoácidos descarboxilasa aromáticos para la enfermedad de Parkinson; beta-glucuronidasa; hexosaminidasa A; timidina quinasa del virus del herpes simple o genes que codifican ARN antisentido para el receptor del factor de crecimiento epidémico para el tratamiento de tumores cerebrales; enzimas de reemplazo del trastorno de almacenamiento lisosomal para Tay-Sachs y otros trastornos de almacenamiento lisosómico; gen que codifica ARN antisentido para el tratamiento del componente cerebral del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Además del gen terapéutico, el ADN plasmídico también puede contener secuencias de ADN antes o después de la secuencia terapéutica y estas partes adicionales del plásmido pueden promover la transcripción específica del tejido del plásmido en una célula particular en el cerebro, puede promover una traducción mejorada y/o estabilización del ARNm del gen terapéutico, y puede permitir la replicación episomal del transgén en las células cerebrales. En general, el gen terapéutico contendrá al menos 100 nucleótidos o tendrá un peso molecular superior a 30.000 Daltons. Se prefiere que el gen terapéutico esté contenido dentro de un plásmido u otro vehículo adecuado para la encapsulación dentro del compartimento interno del liposoma o nanocontenedor.

Un gen terapéutico puede encapsularse dentro del liposoma de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de encapsulación de fármacos bien conocidos. Por ejemplo, encapsulación por sonicación, congelación/descongelación, evaporación y extrusión a través de filtros de membrana.

El número de genes terapéuticos encapsulados dentro del liposoma puede variar de 1 a muchos, dependiendo de la enfermedad que se esté tratando. El factor limitante será el diámetro del gen terapéutico que está encapsulado dentro del liposoma. Usando proteínas policatiónicas tales como histona, protamina o polilisina, es posible compactar el tamaño del ADN plasmídico que contiene varios miles de nucleótidos a una estructura que tiene un diámetro de 10-30 nm. El volumen de un liposoma de diámetro 100 es 1000 veces y 35 veces mayor que el volumen de una esfera compacta de ADN de 10 nm y 30 nm, respectivamente. Por lo tanto, es posible encapsular muchas copias del mismo gen o múltiples copias de múltiples genes dentro del liposoma.

Los agentes bioactivos incluyen oligómeros tales como (1) compuestos antisentido y (2) otros oligómeros bioactivos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "compuesto antisentido" abarca, entre otros, oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla (ADN, tipo ADN, ARN, y tipo ARN) o constructos de cadena doble o autohibridación que comprenden un oligonucleótido de orientación antisentido, ANP antisentido, ribozimas y EGS (descritos más adelante). Los compuestos antisentido pueden ejercer su efecto por una variedad de medios. Uno de tales medios es la dirección mediada por antisentido de una nucleasa endógena, tal como RNasa H en eucariotas o RNasa P en procariotas, o ARNasas bicatenarias en rutas ARNi para el ácido nucleico objetivo (Chiang et al., J. Biol. Chem., 1991, 266, 18162, Forster et al., Science, 1990, 249, 783). Las secuencias que reclutan RNasa P se conocen como Secuencias externas de guía, de ahí la abreviatura "EGS" (Guerrier-Takada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 8468).

Otro tipo de oligómero bioactivo es una molécula de híbrido ARN-ARN que puede modular la expresión génica. El ARN de doble cadena en algunos casos puede describirse como ARN_{pi}. Para los fines de describir una realización de esta invención, un ARN_{pi} es una combinación de una cadena antisentido y una cadena sentido, cada una de una longitud especificada suficiente para exhibir propiedades deseables tales como una estabilidad y especificidad objetivo, por ejemplo, de aproximadamente 8-30, aproximadamente 12-27, aproximadamente 17-25, o aproximadamente 19-23 nucleótidos de longitud. Tal par complementario de oligonucleótidos puede ser de extremo romo o puede incluir nucleótidos adicionales en uno o ambos extremos 5' o 3'. Además, pueden incluir otras moléculas o estructuras moleculares en sus extremos 3' o 5' tales como un grupo fosfato en el extremo 5'.

Un grupo preferido de compuestos de la invención incluye un grupo fosfato en el extremo 5' del compuesto de cadena antisentido. Otros compuestos preferidos también incluyen un grupo fosfato en el extremo 5' del compuesto de cadena sentido. Otros compuestos aún más preferidos incluirían nucleótidos adicionales tales como un saliente de dos bases en el extremo 3'.

El término "otro oligómero bioactivo" abarca, entre otros, aptámeros y señuelos moleculares. Como se usa en la presente memoria, el término se refiere a cualquier oligonucleótido (incluyendo un ARN o ANP) que (1) proporciona un efecto profiláctico, paliativo o terapéutico a un animal que lo necesite y (2) actúa mediante un mecanismo no antisentido, es decir, por algún medio distinto de la hibridación con un ácido nucleico.

En una realización, el agente bioactivo es un aptámero o señuelo molecular. Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios que se unen a ligandos específicos mediante un mecanismo distinto del emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los aptámeros son típicamente dirigidos a, por ejemplo, una proteína y no están diseñados para unirse a un ácido nucleico (Ellington et al., Nature, 1990, 346, 818).

5 Los señuelos moleculares son ácidos nucleicos cortos de doble cadena (que incluyen ácidos nucleicos monocatenarios diseñados para "replegarse" sobre sí mismos) que imitan un sitio sobre un ácido nucleico al que se une un factor, tal como una proteína. Se espera que tales señuelos inhiban competitivamente el factor; es decir, debido a que las moléculas del factor están unidas a un exceso del señuelo, disminuye la concentración del factor unido al sitio celular correspondiente al señuelo, con efectos terapéuticos, paliativos o profilácticos resultantes. Los métodos para identificar y construir moléculas señuelo se describen en, por ejemplo, La patente de Estados Unidos No. 5.716.780 de Edwards et al.

15 Otro tipo de oligómero bioactivo es una molécula híbrida de ARN-ADN que puede dirigir la conversión génica de un ácido nucleico endógeno (Cole-Strauss et al., Science, 1996, 273, 1386). Cualquiera de los oligómeros bioactivos anteriores puede formularse en los liposomas de la invención y utilizarse con fines profilácticos o terapéuticos.

20 En algunas realizaciones de la invención, se selecciona un único oligonucleótido que tiene tanto la porción antisentido como una primera región en el oligonucleótido y la porción sentido como una segunda región en el oligonucleótido. La primera y segunda regiones están unidas entre sí por un enlazador de nucleótidos (una cadena de uno o más nucleótidos que están enlazados entre sí en una secuencia) o por una región de unión no nucleotídica o por una combinación de una estructura de nucleótidos y una estructura no nucleotídica. En cada una de estas estructuras, el oligonucleótido, cuando se repliega sobre sí mismo, sería complementario al menos entre la primera región, la porción antisentido y la segunda región, la porción sentido. De este modo, el oligonucleótido tendría un palíndromo dentro de la estructura en la que la primera región, la porción antisentido en la dirección 5' a 3', es complementaria a la segunda región, la porción sentido en la dirección 3' a 5'.

30 En otras realizaciones, la invención incluye una composición de oligonucleótido/proteína. Esta composición tiene tanto un componente oligonucleotídico como un componente proteico. El componente oligonucleotídico comprende al menos un oligonucleótido, ya sea el oligonucleótido antisentido o sentido, pero preferiblemente el oligonucleótido antisentido (el oligonucleótido que es antisentido al ácido nucleico objetivo). El componente proteico de la composición comprende al menos una proteína que forma una porción del complejo silenciador inducido por ARN, es decir, el complejo RISC. El componente oligonucleotídico puede comprender tanto los oligonucleótidos de cadena sentido como antisentido.

40 RISC es un complejo de ribonucleoproteína que contiene un componente oligonucleotídico y proteínas de la familia de proteínas Argonauta. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, las proteínas Argonauta son una clase de proteínas, algunas de las cuales han demostrado contener un dominio PAZ y Piwi y que han estado implicadas en procesos previamente vinculados al silenciamiento posttranscripcional. La familia de proteínas Argonauta incluye, pero dependiendo de la especie, no están necesariamente limitadas a e1F2C1 y e1F2C2. e1F2C2 también se conoce como GERp95 humana. Aunque no se desea estar limitados por la teoría, por lo menos la cadena de oligonucleótidos antisentido está unida al componente proteico para formar el complejo RISC. Adicionalmente, el complejo también podría incluir el oligonucleótido de cadena sentido.

45 Los compuestos oligoméricos de la invención se pueden usar en forma de compuestos oligoméricos de cadena sencilla, bicatenaria, circular o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Una vez introducidos en un sistema, los compuestos oligoméricos de la invención pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas para efectuar la modificación del ácido nucleico objetivo.

50 Un ejemplo no limitativo de tal proteína es el complejo RISC. El uso del complejo RISC para efectuar la escisión de los objetivos de ARN aumenta con ello en gran medida la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. Papeles similares se han postulado para otras ribonucleasas, tales como aquellas de la familia de enzimas de la RNasa III y ribonucleasa L.

60 En otra realización, el compuesto oligomérico de la invención incluye un oligonucleótido antisentido monocatenario que se une en un complejo RISC, un par antisentido/sentido bicatenario de oligonucleótido o un oligonucleótido de monocatenario que incluye tanto una porción antisentido como una porción sentido. Cada uno de estos compuestos o composiciones se usa para inducir modulación potente y específica de la función génica.

65 Esta modulación específica de la función del gen se ha demostrado en muchas especies mediante la introducción de estructuras de cadena doble, tales como las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) y se ha demostrado que inducen una reducción potente y específica mediada por el antisentido de la función de un gen o sus productos génicos asociados. Este fenómeno ocurre tanto en plantas como animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento de transposones.

Los aptámeros (o anticuerpo de ácido nucleico) son moléculas de ADN monocatenario o bicatenario o de ARN monocatenario que se unen específicamente a objetivos moleculares. Generalmente, los aptámeros actúan inhibiendo las acciones del objetivo molecular, por ejemplo, las proteínas, mediante la unión a combinación del objetivo circulante en la sangre. Ejemplos de aptámeros incluyen al inhibidor GS 522 de antitrombina de Gilead y sus derivados (Gilead Science, Foster City, California, véase también Macaya y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3745-9; Bock et al., (1992) Nature (Londres) 355: 564-566, y Wang et al., (1993) Biochem., 32: 1899-904). De manera similar, pueden utilizarse ARNpi (moléculas de ARN pequeñas de interferencia) como se conoce en la técnica con la presente invención. Véanse las Figuras 8 y 9.

Para las enfermedades que resultan de la expresión inadecuada de genes, la prevención o reducción específica de la expresión de tales genes representa una terapia ideal. En principio, la producción de un producto génico particular puede ser inhibida, reducida o apagada por hibridación de un desoxinucleótido o ribodesoxinucleótido monocatenario complementario a una secuencia accesible en el ARNm o una secuencia dentro del transcrito que es esencial para el procesamiento previo de ARNm, o a una secuencia dentro del mismo gen. Este paradigma para el control genético se denomina a menudo inhibición antisentido o antigénica.

Los compuestos antisentido son oligonucleótidos que se diseñan para unirse y deshabilitarse o prevenir la producción del ARNm responsable de generar una proteína particular. Los compuestos antisentido pueden proporcionar una función terapéutica mediante la inhibición *in vivo* de la formación de una o más proteínas que causan o están implicadas con la enfermedad. Se ha informado que los compuestos antisentido complementarios a cierto ARN mensajero del gen o secuencias virales inhiben la propagación de la enfermedad relacionada con agentes infecciosos virales y retrovirales (véase, por ejemplo, Matsukura et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7706, y las referencias citadas allí). Otros han informado que los oligonucleótidos pueden unirse al ADN dúplex a través de la formación de triple hélice y la inhibición de la transcripción y/o la síntesis de ADN.

Los compuestos antisentido incluyen ARN o ADN antisentido, oligonucleótidos de cadena sencilla o doble, o sus análogos, que pueden hibridarse específicamente con especies de ARNm individuales e impedir la transcripción y/o el procesamiento de ARN de la especie de ARNm y/o la traducción del polipéptido codificado y por lo tanto efectúa una reducción en la cantidad del respectivo polipéptido codificado (véase Ching et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10006-10010 (1989), Broder et al., Ann. Int. Med. 113: 604-618 (1990); Loreau et al., FEBS Letters 274: 53-56 (1990)).

Los compuestos de triple hélice (también denominados fármacos de triple cadena) son oligonucleótidos que se unen a secuencias de ADN bicatenario y están destinados a inhibir selectivamente la transcripción de genes que causan enfermedades, tales como genes virales, por ejemplo, VIH y virus del herpes simple y oncogenes, es decir, detienen la producción de proteínas en el núcleo celular. Estos fármacos se unen directamente al ADN bicatenario en el genoma de la célula para formar una triple hélice y, por lo tanto, impiden que la célula produzca una proteína objetivo (véase, por ejemplo, la patente de los estados unidos No. 5.176.996, Hogan et al., 5 de enero de 1993).

La especificidad de sitio de oligonucleótidos (por ejemplo, compuestos antisentido y fármacos de triple hélice) no se ve afectada significativamente por la modificación del enlace fosfodiéster o por modificación química del extremo terminal de oligonucleótido. En consecuencia, estos oligonucleótidos pueden ser modificados químicamente; aumentando la estabilidad general de unión, aumentando la estabilidad con respecto a la degradación química, aumentando la velocidad a la que los oligonucleótidos son transportados a las células y confiriendo reactividad química a las moléculas. El enfoque general para construir diversos oligonucleótidos útiles en terapia antisentido ha sido revisado por vander Krol et al., (1988) Biotechniques 6: 958-976 y Stein et al., (1988) Cancer Res. 48: 2659-2668.

Por consiguiente, los aptámeros, compuestos antisentido y fármacos de triple hélice también pueden incluir sustituciones, adiciones, supresiones o transposiciones de nucleótidos, siempre y cuando la hibridación específica o la asociación con la secuencia objetivo relevante se retenga como una propiedad funcional del oligonucleótido. Por ejemplo, algunas realizaciones emplearán análogos de fosforotioato que son más resistentes a la degradación por nucleasas que sus contrapartes de diéster fosfato naturales y por lo tanto se espera que tengan una mayor persistencia *in vivo* y mayor potencia (véase Campbell et al., J. Biochem. Biophys. Methods 20: 259-267). También se sabe que los derivados de fosforamidato de los oligonucleótidos se unen a polinucleótidos complementarios y tienen la capacidad adicional de acomodar especies de ligando unidas covalentemente y serán susceptibles a los métodos de la presente invención (véase Froehler et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16 (11): 4831).

Además, en la presente invención se pueden emplear análogos de nucleótidos, por ejemplo, en los que el azúcar o la base se modifican químicamente. Las formas análogas de purinas y pirimidinas son aquellas generalmente conocidas en la técnica, muchas de las cuales se usan como agentes quimioterapéuticos.

La modificación terminal también proporciona un procedimiento útil para modificar la especificidad del tipo celular, la farmacocinética, la permeabilidad nuclear y la tasa absoluta de absorción de las células por los agentes farmacéuticos oligonucleotídicos. Por ejemplo, las sustituciones en los extremos 5' y 3' incluyen grupos reactivos que permiten el entrecruzamiento covalente del agente farmacéutico basado en nucleótidos con otras especies y grupos voluminosos que mejoran la captación celular (véase Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression, (1989) Cohen, Ed., CRC Press, Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapeutics for Cancer y AIDS, (1991), Wickstrom, Ed., Wiley-Liss, Gene Regulation: Biology of Antisense ARN and DNA, (1992) Erickson and Izant, Eds., Raven Press, y Antisense RNA y DNA, (1992), Murray, Ed., Wiley-Liss. Para métodos generales relacionados con compuestos antisentido, véase Antisense RNA y DNA, (1988), DA Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Un polinucleótido puede administrarse a una célula para expresar una secuencia de nucleótidos exógena, para inhibir, eliminar, aumentar o alterar la expresión de una secuencia de nucleótidos endógena, o para afectar una característica fisiológica específica no asociada naturalmente con la célula. El polinucleótido puede ser una secuencia cuya presencia o expresión en una célula altera la expresión o función de genes o ARN celular. Un polinucleótido suministrado puede permanecer dentro del citoplasma o el núcleo aparte del material genético endógeno. Alternativamente, el ADN puede recombinarse con (convertido en una parte del) material genético endógeno. La recombinación puede hacer que el ADN se inserte en el ADN cromosómico mediante recombinación homóloga o no homóloga.

Un inhibidor de expresión génica basado en un polinucleótido comprende cualquier polinucleótido que contenga una secuencia cuya presencia o expresión en una célula provoca la degradación o inhibición de la función, transcripción o traducción de un gen de una manera específica de secuencia. Los inhibidores de la expresión basados en polinucleótidos pueden seleccionarse del grupo que comprende: ARNpi, microARN, ARN interferente o ARNi, ARNbc, ribozimas, polinucleótidos antisentido y casetes de expresión de ADN que codifican ARNpi, microARN, ARNbc, ribozimas o ácidos nucleicos antisentido. El ARNpi comprende una estructura bicatenaria que contiene típicamente 15-50 pares de bases y preferiblemente 19-25 pares de bases y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen o ARN objetivo expresado dentro de la célula. Un ARNpi puede estar compuesto de dos polinucleótidos hibridados o un solo polinucleótido que forma una estructura en horquilla.

Los microARN (miARN) son pequeños polinucleótidos no codificantes, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, que dirigen la destrucción o la represión de la traducción de sus objetivos de ARNm. Los polinucleótidos antisentido comprenden una secuencia que es complementaria a un gen o ARNm. Los polinucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a: morfolinós, polinucleótidos 2'-O-metilo, ADN, ARN y similares. El inhibidor de expresión basado en polinucleótidos puede polimerizarse *in vitro*, recombinante, contiene secuencias quiméricas o derivados de estos grupos. El inhibidor de la expresión basado en polinucleótidos puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos, o cualquier combinación adecuada de tal forma que el ARN y/o gen objetivo sean inhibidos.

Los polinucleótidos pueden contener un casete de expresión codificado para expresar una proteína total o parcial, o ARN. Un casete de expresión se refiere a un polinucleótido natural o producido de forma recombinante que es capaz de expresar una secuencia. El casete contiene la región codificante del gen de interés junto con cualquier otra secuencia que afecte la expresión de la secuencia de interés. Un casete de expresión incluye típicamente un promotor (que permite la iniciación de la transcripción) y una secuencia transcrita. Opcionalmente, el casete de expresión puede incluir, pero no está limitado a, potenciadores de la transcripción, secuencias no codificantes, señales de empalme, señales de terminación de la transcripción y señales de poliadenilación. Un casete de expresión de ARN incluye típicamente un codón de inicio de la traducción (que permite el inicio de la traducción) y una secuencia que codifica una o más proteínas. Opcionalmente, el casete de expresión puede incluir, pero no está limitado a, las señales de terminación de la traducción, una secuencia de poliadenosina, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y secuencias no codificantes. El polinucleótido puede contener secuencias que no cumplen una función específica en la célula objetivo pero que se usan en la generación del polinucleótido. Tales secuencias incluyen, pero no se limitan a, secuencias requeridas para la replicación o selección del polinucleótido en un organismo huésped.

En ciertas realizaciones de la invención, como se ha indicado anteriormente, se usan membranas o liposomas fusogénicas de saposina para facilitar el suministro de moléculas de ácido nucleico mayores que los ANpi convencionales, incluyendo precursores grandes de ácidos nucleicos de ANpi. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se pueden emplear para aumentar el suministro de ácidos nucleicos mayores que representan "precursores" para los ANpi deseados, en los que los aminoácidos precursores pueden o bien escindirse o procesarse antes, durante o después del suministro a una célula objetivo para formar un ANpi activo para modular la expresión génica dentro de la célula objetivo. Por ejemplo, un polinucleótido precursor de ANpi puede seleccionarse como un polinucleótido monocatenario circular, que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una parte de la misma y en la que el

polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de ANpi activa capaz de mediar ARNi.

5 En células de mamífero, los ARNbc de más de 30 pares de bases pueden activar la quinasa PKR dependiente de ARNbc y la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa, normalmente inducida por interferón. La PKR activada inhibe la traducción general por fosforilación del factor eucariota de inicio de la traducción, el factor 2 α (eIF2 α), mientras que la 2'-5'-oligoadenilato sintetasa provoca la degradación no específica del ARNm a través de la activación de la RNasa L. Debido a su pequeño tamaño (refiriéndose particularmente a las formas no precursoras), usualmente
10 menos de 30 pares de bases, y más comúnmente entre aproximadamente 17-19, 19-21 o 21-23 pares de bases, los ANpi de la presente invención evitan la activación de la respuesta del interferón.

15 En contraste con el efecto no específico de ARNbc largo, el ARNpi puede mediar el silenciamiento selectivo de genes en el sistema de mamífero. Los ARN de horquilla, con un bucle corto y de 19 a 27 pares de bases en el tallo, también silencian selectivamente la expresión de genes que son homólogos a la secuencia en el tallo de doble cadena. Las células de mamíferos pueden convertir el ARN de horquilla corta en ARNpi para mediar el silenciamiento selectivo de genes.

20 RISC media la escisión del ARN de cadena sencilla que tiene secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNpi. La escisión del ARN objetivo tiene lugar en el centro de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNpi. Los estudios han demostrado que 21 nucleótidos del dúplex de ARNpi son más activos cuando contienen dos nucleótidos sobresalientes en 3'. Además, la sustitución completa de una o ambas cadenas de ARNpi con nucleótidos 2'-desoxi (2'-H) o 2'-O-metilo suprime la actividad de ARNi, mientras que la sustitución de los nucleótidos sobresalientes de ARNpi en el extremo terminal 3' con desoxinucleótidos (2'-H) ha sido reportado como tolerado.
25

Los estudios han demostrado que la sustitución de los segmentos sobresalientes en 3' de un dúplex de ARNpi de 21 mer que tiene 2 nucleótidos sobresalientes en 3' con desoxirribonucleótidos no tiene un efecto adverso sobre la actividad de ARNi. El reemplazo de hasta 4 nucleótidos en cada extremo del ARNpi con desoxirribonucleótidos se ha informado que es bien tolerado mientras que la sustitución completa con desoxirribonucleótidos da como resultado ninguna actividad de ARNi.
30

Alternativamente, los ANpi se pueden administrar como productos de transcripción únicos o múltiples expresados por un vector polinucleótido que codifica los ANpi únicos o múltiples y que dirigen su expresión dentro de las células objetivo. En estas realizaciones, la porción bicatenaria de un producto de transcripción final de los ARNpi que se expresar dentro de la célula objetivo puede ser, por ejemplo, de 15 a 49 pb, 15 a 35 pb, o aproximadamente 21 a 30 pb de longitud. En los ejemplos de realizaciones, las porciones bicatenarias de ANpi, en las que dos cadenas se emparejan, no están limitadas a segmentos de nucleótidos completamente emparejados, y pueden contener porciones no emparejadas debido a falta de coincidencia (los nucleótidos correspondientes no son complementarios), protuberancias (carencia en el nucleótido complementario correspondiente en una cadena), salientes, y similares. Las porciones no emparentadas pueden estar contenidas en la medida en que no interfieran con la formación de ANpi. En realizaciones más detalladas, una "protuberancia" puede comprender 1 a 2 nucleótidos no emparejados, y la región bicatenaria de los ANpi en la que dos cadenas se emparejan puede contener desde aproximadamente 1 a 7, o aproximadamente 1 a 5 protuberancias. Además, las porciones "no correspondientes" contenidas en la región bicatenaria de los ANpi pueden estar presentes en números de aproximadamente 1 a 7, o de aproximadamente 1 a 5. Muy a menudo en el caso de las faltas de correspondencia, uno de los nucleótidos es guanina y la otro es uracilo. Tal falta de correspondencia puede ser atribuible, por ejemplo, a una mutación de C a T, G a A, o mezclas de los mismos, en un ADN correspondiente que codifica ARN sentido, pero también se contemplan otras causas. Además, en la presente invención, la región bicatenaria de los ANpi en las que se emparejan dos cadenas puede contener tanto protuberancias como porciones no correspondientes en los intervalos numéricos aproximados especificados.
35
40
45
50

La estructura terminal de los ANpi de la invención puede ser roma o cohesiva (sobresaliente) siempre y cuando el ANpi conserve su actividad para silenciar la expresión de los genes objetivo. La estructura de extremo cohesivo (que sobresale) no se limita solamente a la saliente 3' según lo informado por otros. Por el contrario, la estructura saliente 5' puede incluirse siempre que sea capaz de inducir un efecto silenciador de genes tal como mediante ARNi. Además, el número de nucleótidos sobresalientes no está limitado a los límites informados de 2 o 3 nucleótidos, sino que puede ser cualquier número siempre y cuando la saliente no perjudique la actividad silenciadora de genes del ANpi. Por ejemplo, las salientes pueden comprender de aproximadamente 1 a 8 nucleótidos, más a menudo de aproximadamente 2 a 4 nucleótidos. La longitud total de los ANpi que tienen estructura final cohesiva se expresa como la suma de la longitud de la porción de doble hélice apareada y la de un par que comprende cadenas individuales sobresalientes en ambos extremos. Por ejemplo, en el caso de ejemplo de un ARN de doble cadena de 19 pb con 4 salientes de nucleótidos en ambos extremos, la longitud total se expresa como 23 pb. Además, puesto que la secuencia sobresaliente puede tener una especificidad baja por un gen objetivo, no es necesariamente complementaria (antisentido) o idéntica (sentido) a la secuencia génica objetivo. Además, mientras el ANpi sea capaz de mantener su efecto de silenciamiento genético sobre el gen objetivo, puede contener una estructura de bajo peso molecular (por ejemplo, una molécula de ARN natural
55
60
65

tal como ARNt, ARNr o ARN viral o una molécula de ARN artificial) por ejemplo, en la parte sobresaliente en un extremo.

Además, la estructura terminal de los ANpi puede tener una estructura de tallo-bucle en la que los extremos de un lado del ácido nucleico bicatenario están conectados por un ácido nucleico enlazador, por ejemplo, un ARN enlazador. La longitud de la región bicatenaria (porción de tallo-bucle) puede ser, por ejemplo, de 15 a 49 pb, a menudo de 15 a 35 pb, y más comúnmente de aproximadamente 21 a 30 pb de largo. Alternativamente, la longitud de la región bicatenaria que es un producto de transcripción final de ANpi que se expresa en una célula objetivo puede ser, por ejemplo, aproximadamente de 15 a 49 pb, 15 a 35 pb, o aproximadamente 21 a 30 pb de longitud. Cuando se emplean segmentos enlazadores, no hay limitación particular en la longitud del enlazador, siempre y cuando no impida el emparejamiento de la porción del tallo. Por ejemplo, para el emparejamiento estable de la porción del tallo y la supresión de la recombinación entre los ADN que codifican esta porción, la porción enlazadora puede tener una estructura de ARNt de hoja de trébol. Incluso si el enlazador tiene una longitud que impida el emparejamiento de la porción del tallo, es posible, por ejemplo, construir la porción enlazadora para que incluya intrones de modo que los intrones sean escindidos durante el procesamiento de un ARN precursor en ARN maduro, permitiendo así el emparejamiento de la porción del tallo. En el caso de un ANpi de tallo-bucle, cada extremo (cabeza o cola) del ARN sin estructura de bucle puede tener un ARN de bajo peso molecular. Como se ha descrito anteriormente, estos ARN de bajo peso molecular pueden incluir una molécula de ARN natural, tal como ARNt, ARNr o ARN viral, o una molécula de ARN artificial.

El ANpi también puede comprender un polinucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma (por ejemplo, cuando dicha molécula de ANpi no requiere la presencia dentro de la molécula de ANpi de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma), en donde el polinucleótido monocatenario puede comprender además un grupo fosfato terminal, tal como un 5'-fosfato (véase por ejemplo Martínez et al., Cell., 110: 563-574 (2002) y Schwarz et al., Molecular Cell, 10: 537-568 (2002), o 5', 3'-difosfato.

Tal como se usa en la presente memoria, el término molécula de ANpi no se limita a moléculas que contienen sólo ARN o ADN de origen natural, sino que también abarca nucleótidos modificados químicamente y no nucleótidos. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico cortos de interferencia de la invención carecen de nucleótidos que contienen 2'-hidroxi (2'-OH). En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos cortos de interferencia no requieren la presencia de nucleótidos que tengan un grupo 2'-hidroxi para mediar ARNi y como tales, las moléculas de ácido nucleico cortos de interferencia de la invención opcionalmente no incluyen ningún ribonucleótido (por ejemplo, nucleótidos que tienen un grupo 2'-OH). Tales moléculas de ANpi que no requieren la presencia de ribonucleótidos dentro de la molécula de ANpi para soportar ARNi pueden, sin embargo, tener un enlazador o enlazadores unidos u otros grupos, fracciones o cadenas unidos o asociados que contengan uno o más nucleótidos con grupos 2'-OH. Opcionalmente, las moléculas de ANpi pueden comprender ribonucleótidos en aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, o 50% de las posiciones de los nucleótidos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término ANpi se pretende que sea equivalente a otros términos usados para describir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar ARNi específico de secuencia, por ejemplo ARN pequeño de interferencia (ARNpi), ARN bicatenario (ARNbc), micro ARN (mARN), ARN corto de horquilla (ARNch), oligonucleótido pequeño de interferencia, ácido nucleico pequeño de interferencia, oligonucleótido modificado pequeño de interferencia, ARNpi modificado químicamente, ARN silenciador de genes posttranscripcional (ARNpost) y otros.

En otras realizaciones, las moléculas de ANpi para uso dentro de la invención pueden comprender secuencias o regiones sentido y antisentido separadas, en donde las regiones sentido y antisentido están unidas covalentemente por moléculas enlazadoras nucleotídicas o no nucleotídicas, o están alternativamente unidas no covalentemente por interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y/o interacciones de apilamiento.

"ARN antisentido" es una cadena de ARN que tiene una secuencia complementaria a un gen objetivo de ARNm, y se cree que induce ARNi uniéndose al gen objetivo de ARNm. El "ARN sentido" tiene una secuencia complementaria al ARN antisentido, y se hibridó con su ARN antisentido complementario para formar ARNpi.

Estos ARN antisentido y sentido se han sintetizado convencionalmente con un sintetizador de ARN. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "constructo de ARNi" es un término genérico utilizado a lo largo de la memoria descriptiva para incluir ARN pequeños de interferencia (ARNpi), ARN de horquilla y otras especies de ARN que pueden escindirse *in vivo* para formar ARNpi. Los constructos de ARNi en la presente memoria también incluyen vectores de expresión (también denominados vectores de expresión de ARNi) capaces de dar lugar a transcritos que forman ARNbc o ARN de horquilla en células y/o transcritos que pueden producir ARNpi *in vivo*. Opcionalmente, el ARNpi incluye cadenas simples o cadenas dobles de ARNpi.

Una molécula híbrida pequeña de interferencia es un ácido nucleico bicatenario que tiene una función similar al ARNpi. En lugar de una molécula de ARN bicatenario, un híbrido pequeño de interferencia está compuesto por una cadena de ARN y una cadena de ADN. Preferiblemente, la cadena de ARN es la cadena antisentido, ya que es la cadena que se une al ARNm objetivo. El híbrido pequeño de interferencia creado por la hibridación de las cadenas de ADN y ARN tiene una porción complementaria hibridada y preferiblemente al menos un extremo sobresaliente en 3'.

Los ANpi para uso dentro de la invención se pueden ensamblar a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido, en donde las cadenas antisentido y sentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia nucleotídica que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena, tal como donde la cadena antisentido y la cadena sentido forman una estructura dúplex o bicatenaria, por ejemplo en donde la región bicatenaria es de aproximadamente 19 pares de bases). La cadena antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma y la cadena sentido puede comprender una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma. Alternativamente, se pueden ensamblar ANpi a partir de un único oligonucleótido, en donde las regiones autocomplementarias sentido y antisentido del ANpi están unidas por medio de un enlazador o enlazadores basados en ácido nucleico o en ácido no nucleico.

Dentro de realizaciones adicionales, los ANpi para administración intracelular de acuerdo con los métodos y composiciones de la invención pueden ser un polinucleótido con una estructura secundaria de dúplex, dúplex asimétrico, horquilla u horquilla asimétrica, que tiene regiones sentido y antisentido autocomplementarias, en donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico objetivo separada o una porción de la misma y la región sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico objetivo o una porción de la misma.

Ejemplos no limitativos de modificaciones químicas que pueden hacerse en un ANpi incluyen, sin limitación, enlaces fosforotioato internucleótido, 2'-desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos 2'-O-metilo, 2'-desoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos "base universal", nucleótidos "acíclicos", nucleótidos 5-C-metilo, y la incorporación de un residuo terminal glicerilo y/o desoxi-abásico invertido. Estas modificaciones químicas, cuando se usan en diversos constructos de ANpi, se muestran para preservar la actividad de ARNi en células mientras que, al mismo tiempo, aumentan dramáticamente la estabilidad en suero de estos compuestos.

En un ejemplo no limitativo, la introducción de nucleótidos modificados químicamente en moléculas de ácido nucleico proporciona una potente herramienta para superar las limitaciones potenciales de estabilidad *in vivo* y la biodisponibilidad inherente a las moléculas de ARN nativas que se suministran exógenamente. Por ejemplo, el uso de moléculas de ácido nucleico modificadas químicamente puede permitir una dosis más baja de una molécula de ácido nucleico particular para un efecto terapéutico dado, puesto que las moléculas de ácido nucleico químicamente modificadas tienden a tener una semivida más larga en el suero. Además, ciertas modificaciones químicas pueden mejorar la biodisponibilidad de moléculas de ácido nucleico mediante el direccionamiento a células o tejidos particulares y/o mejorando la captación celular de la molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, incluso si la actividad de una molécula de ácido nucleico químicamente modificada se reduce en comparación con una molécula de ácido nucleico nativa, por ejemplo, cuando se compara con una molécula de ácido nucleico completamente de ARN, la actividad total de la molécula de ácido nucleico modificada puede ser mayor que la de la molécula nativa debido a la estabilidad y/o suministro mejorado de la molécula. A diferencia del ANpi natural no modificado, el ANpi modificado químicamente también puede minimizar la posibilidad de activar la actividad del interferón en seres humanos.

Las moléculas de ANpi descritas en este documento, la región antisentido de una molécula de ANpi de la invención pueden comprender un enlace internucleótido fosforotioato en el extremo 3' de dicha región antisentido. En cualquiera de las realizaciones de las moléculas de ANpi descritas en el presente documento, la región antisentido puede comprender aproximadamente de uno a aproximadamente cinco enlaces internucleótidos fosforotioato en el extremo 5' de dicha región antisentido. En cualquiera de las realizaciones de las moléculas de ANpi descritas en la presente memoria, los salientes de nucleótidos en el extremo terminal 3' de una molécula de ANpi de la invención pueden comprender ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que se modifican químicamente en un azúcar, una base o una cadena principal de ácido nucleico. En cualquiera de las realizaciones de moléculas de ANpi descritas en este documento, los salientes de nucleótidos del extremo terminal 3' pueden comprender uno o más ribonucleótidos base universales. En cualquiera de las realizaciones de las moléculas de ANpi descritas en este documento, los salientes de nucleótidos del extremo terminal 3' pueden comprender uno o más nucleótidos acíclicos.

Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo, la invención presenta un ácido nucleico pequeño de interferencia (ANpi) modificado químicamente que tiene aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más enlaces internucleótido fosforotioato en una cadena de ANpi. En otra realización más, la invención presenta un ácido nucleico corto de interferencia modificado químicamente (ANpi) que tiene individualmente aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o

más enlaces internucleótido fosforotioato en ambas cadenas de ANpi. Los enlaces internucleótido fosforotioato pueden estar presentes en una o ambas cadenas de oligonucleótido del dúplex de ANpi, por ejemplo, en la cadena sentido, en la cadena antisentido o en ambas cadenas. Las moléculas de ANpi de la invención pueden comprender uno o más enlaces internucleótido fosforotioato en el extremo 3', el extremo 5', o ambos extremos 3' y 5' de la cadena sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas. Por ejemplo, un ejemplo de una molécula de ANpi de la invención puede comprender aproximadamente 1 a aproximadamente 5 o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más) enlaces internucleótido fosforotioato consecutivos en el extremo 5' de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas. En otro ejemplo no limitativo, una molécula de ANpi ejemplar de la invención puede comprender uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) enlaces internucleótido fosforotioato de pirimidina en la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas. En otro ejemplo no limitativo, un ejemplo de molécula de ANpi de la invención puede comprender uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) enlaces internucleótido fosforotioato de purina en la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas.

Una molécula de ANpi puede estar constituida por una molécula de ácido nucleico circular, en la que el ANpi es de aproximadamente 38 a aproximadamente 70 (por ejemplo, aproximadamente 38, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 70) nucleótidos de longitud que tiene aproximadamente 18 a aproximadamente 23 (por ejemplo, aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22 o 23) pares de bases en los que el oligonucleótido circular forma una estructura con forma de pesas que tiene aproximadamente 19 pares de bases y 2 bucles.

Una molécula de ANpi circular contiene dos motivos de bucle, en el que una o ambas porciones de bucle de la molécula de ANpi son biodegradables. Por ejemplo, una molécula de ANpi circular de la invención está diseñada de tal manera que la degradación de las porciones de bucle de la molécula de ANpi in vivo puede generar una molécula de ANpi bicatenario con salientes en el extremo terminal 3', tales como salientes de nucleótidos en el extremo terminal que comprende aproximadamente 2 nucleótidos.

Los nucleótidos modificados presentes en moléculas de ANpi, preferiblemente en la cadena antisentido de las moléculas de ANpi, pero también opcionalmente en las cadenas sentido y/o tanto antisentido como sentido, comprenden nucleótidos modificados que tienen propiedades o características similares a los ribonucleótidos naturales. Por ejemplo, la invención presenta moléculas de ANpi que incluyen nucleótidos modificados que tienen una conformación Northern (por ejemplo, ciclo de pseudorrotación Northern, véase por ejemplo Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, 1984). Como tal, los nucleótidos modificados químicamente presentes en las moléculas de ANpi de la invención, preferiblemente en la cadena antisentido de las moléculas de ANpi de la invención, pero también opcionalmente en las cadenas sentido y/o tanto antisentido como sentido, son resistentes a la degradación por la nucleasa mientras que al mismo tiempo mantienen la capacidad de mediar el ARNi. Ejemplos no limitativos de nucleótidos que tienen una configuración Northern incluyen nucleótidos de ácido nucleico bloqueados (LNA) (por ejemplo, nucleótidos 2'-O, 4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo)); nucleótidos 2'-metoxietoxi (MOE); nucleótidos 2'-metil-tio-etilo, 2'-desoxi-2'-fluoro. Nucleótidos 2'-desoxi-2'-cloro, nucleótidos 2'-azido y nucleótidos 2'-O-metilo.

La cadena sentido de una molécula de ANpi bicatenario puede tener una fracción de caperuza terminal tal como una fracción deoxibásica invertida, en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos 3' y 5' de la cadena de sentido.

Un ANpi además puede comprender además de un nucleótido, un no nucleótido o un enlazador nucleótido/no nucleótido mixto que une la región de sentido del ANpi con la región antisentido del ANpi. En una realización, un enlazador de nucleótidos puede ser un enlazador de > 2 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud. En otra realización, el enlazador de nucleótidos puede ser un aptámero de ácido nucleico. Por "aptámero" o "aptámero de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula objetivo en la que la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia que comprende una secuencia reconocida por la molécula objetivo en su configuración natural. Alternativamente, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une a una molécula objetivo en la que la molécula objetivo no se une naturalmente a un ácido nucleico. La molécula objetivo puede ser cualquier molécula de interés. Por ejemplo, el aptámero se puede usar para unirse a un dominio de unión al ligando de una proteína, evitando de este modo la interacción del ligando de origen natural con la proteína. Este es un ejemplo no limitativo y los expertos en la técnica reconocerán que se pueden generar fácilmente otras realizaciones usando técnicas generalmente conocidas en la técnica. [Véase, por ejemplo, Gold et al., Annu. Rev. Biochem., 64: 763 (1995); Brody y Gold, J. Biotechnol., 74: 5 (2000); Sun, Curr. Opin. Mol. Ther., 2: 100 (2000); Kusser, J. Biotechnol., 74: 27 (2000); Hermann y Patel, Science 287: 820 (2000); y Jayasena, Clinical Chemistry, 45: 1628 (1999).

Un enlazador no nucleotídico puede estar constituido por un nucleótido, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, carbohidrato, lípido, polihidrocarburo u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, polietilenglicoles tales como los que tienen entre 2 y 100 unidades de etilenglicol). Ejemplos específicos incluyen los descritos por Seela y Kaiser, Nucleic Acids Res., 18: 6353 (1990) y Nucleic Acids Res., 15: 3113 (1987); Cload y Schepartz, J. Am. Chem. Soc., 113: 6324 (1991); Richardson y Schepartz, J. Am. Chem. Soc., 113: 5109 (1991); Ma et al., Nucleic

Acids Res., 21: 2585 (1993) y Biochemistry 32: 1751 (1993); Durand et al., Nucleic Acids Res., 18: 6353 (1990); McCurdy et al., Nucleosides & Nucleotides, 10: 287 (1991); Jsche et al., Tetrahedron Lett., 34: 301 (1993); Ono et al., Biochemistry, 30: 9914 (1991); Arnold et al., publicación internacional No. WO 89/02439; Usman et al., publicación internacional No. WO 95/06731; Dudycz et al., publicación internacional No. WO 95/11910 y Ferentz y Verdine, J. Am. Chem. Soc., 113: 4000 (1991). Un "no nucleótido" significa además cualquier grupo o compuesto que puede ser incorporado en una cadena de ácido nucleico en lugar de una o más unidades nucleotídicas, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permite que las bases restantes exhiban su actividad enzimática. El grupo o compuesto puede ser abásico porque no contiene una base nucleotídica comúnmente reconocida, tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo o timidina, por ejemplo, en la posición C1 del azúcar.

La síntesis de una molécula de ANpi de la invención, que puede ser modificada químicamente, comprende: (a) síntesis de dos cadenas complementarias de la molécula de ANpi; (b) hibridación de las dos cadenas complementarias juntas bajo condiciones adecuadas para obtener una molécula de ANpi bicatenario. En otra realización, la síntesis de las dos cadenas complementarias de la molécula de ANpi es mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. En otra realización más, la síntesis de las dos cadenas complementarias de la molécula de ANpi es mediante síntesis de oligonucleótidos en tándem en fase sólida.

Los oligonucleótidos (por ejemplo, ciertos oligonucleótidos modificados o porciones de oligonucleótidos que carecen de ribonucleótidos) se sintetizan usando protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Caruthers et al., 1992, Methods in Enzymology 211, 3-19, Thompson et al., publicación internacional PCT No. WO 99/54459, Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2668, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59, Brennan et al., 1998, Biotechnol Bioeng., 61, 33-45, y Brennan, patente estadounidense No. 6.001.311. La síntesis de ARN, incluyendo ciertas moléculas de ANpi de la invención, sigue procedimientos generales como se describe, por ejemplo, en Usman et al., 1987, J. Am. Chem. Soc., 109, 7845; Scaringe et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 5433; y Wincott et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23, 2677-2678, Wincott et al., 1997, Methods Mol. Bio., 74, 59.

Medicamentos heterocíclicos

Los fármacos heterocíclicos, y particularmente los que contienen al menos un anillo heterocíclico de nitrógeno, se pueden emplear como agentes farmacéuticos en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la yohimbina es un alcaloide indol que bloquea los receptores alfa-2-adrenérgicos. Sus efectos periféricos son aumentar la actividad colinérgica al mismo tiempo que disminuyen la actividad adrenérgica. Esta combinación ha llevado al uso de yohimbina en el tratamiento y la clasificación diagnóstica de ciertos tipos de impotencia eréctil masculina.

Otros ejemplos de fármacos heterocíclicos incluyen, aunque sin limitación, morfina, metotrexato (anteriormente Ametopterina, ácido N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)-metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico), Lorazepam (7-cloro-5-(o-clorofenil)-1,3-dihidro-3-hidroxi-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona), 6-Mercaptopurina, (1,7-dihidro-6H-purina-6-tiona monohidratada), 5-fluorouracilo, nicotina, ácido nicotínico y niacina.

Formulaciones y suministro de agentes farmacéuticos

Las composiciones de la presente invención comprenden generalmente una proteína o polipéptido fusogénico de saposina, que está asociado con un liposoma aniónico compuesto por al menos un lípido aniónico de cadena larga, con o sin al menos un lípido neutro de cadena larga y al menos un lípido de cadena corta, neutro o aniónico, que contiene un agente farmacéutico o de formación de imágenes en una cantidad segura y eficaz para el efecto deseado, todo contenido en un vehículo farmacéuticamente aceptable con un pH apropiado. Una cantidad segura y eficaz del agente activo se define como una cantidad que podría causar el efecto cosmético o terapéutico deseado en un paciente. Un experto en la materia, experto en la presente invención, tendría conocimiento de las proporciones de dosificación apropiadas.

La dosis apropiada administrada en cualquier caso dado, por supuesto, variará dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente farmacéutico particular, y su modo y vía de administración; la edad, el estado general de salud, el metabolismo, el peso del receptor y otros factores que influyen en la respuesta al compuesto; el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

En una realización, la invención comprende un agente farmacéutico deseado, en una cantidad segura y eficaz, que se incorpora en liposomas aniónicos, en una solución acuosa regulada de un pH de aproximadamente 5,5 o menos. La proteína o polipéptido fusogénico preferido es saposina C, en concentraciones de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 100 nM (nanomolar), preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nM, que luego se introduce en la mezcla del agente farmacéutico-liposoma. La concentración de los liposomas está en exceso con respecto a la de la proteína o polipéptido fusogénico y es aproximadamente un exceso de 1 a 10 veces, en relación molar, o aproximadamente un exceso de 3 a 7 veces respecto al de la saposina C (es

decir, al menos un 1:10 en relación molar de saposina C: liposoma). En esta realización, al menos un agente de formación de imágenes que tiene al menos una propiedad de formación de imágenes puede añadirse a la composición liposomal. Alternativamente, en esta realización, el agente farmacéutico puede ser sustituido con el agente de formación de imágenes.

5 En una realización, el liposoma contiene al menos un tipo de lípido de cadena larga cargado negativamente tal como dioleoilfosfatidilserina (DOPS). Los liposomas pueden estar hechos de cualquier mezcla de lípidos que contengan una cantidad adecuada de lípidos aniónicos de cadena larga. En una realización particular, los liposomas se preparan a partir de una mezcla que contiene lípidos aniónicos de cadena larga (tales como DOPS o dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG)), lípidos neutros de cadena larga (tales como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)), y lípidos neutros de cadena corta (tales como DHPC). La carga total del liposoma resultante derivado de la mezcla de lípidos es negativa. Los fosfolípidos de cadena corta también pueden cargarse negativamente.

15 Una composición de este tipo podría aplicarse entonces tópicamente a la piel o administrarse a otros tejidos o al cerebro y al SNC a través de los métodos descritos en la presente memoria. Otros ejemplos de preparación de tales complejos de proteína de fusión de liposomas, en los que está contenido un agente activo dentro del liposoma, se presentan en la patente de Estados Unidos No. 6.099.857 de Gross, 8 de agosto de 2000 y en la patente de Estados Unidos No. 5.766.626 de Gross, 16 de junio de 1998, que se incorporan aquí como referencia.

Suministro transdérmico

25 Los complejos agente farmacéutico-modificador químico descritos en la presente memoria pueden administrarse en forma transdérmica. La administración transdérmica implica típicamente la administración de un agente farmacéutico para el paso percutáneo del fármaco en la circulación sistémica del paciente. Los sitios de la piel incluyen regiones anatómicas para administrar en forma transdérmica el fármaco e incluyen el antebrazo, el abdomen, el pecho, la espalda, la nalga, el área mastoidea y similares.

30 La administración transdérmica se consigue exponiendo una fuente del complejo a la piel de un paciente durante un período de tiempo prolongado. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de permitir la administración controlada de un agente farmacéutico al cuerpo (véase *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc. (1989), *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987) y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987)). Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo, dispersando o bien incorporando el agente farmacéutico, la saposina C y los liposomas aniónicos en un medio adecuado, tal como un material de matriz elastomérica. También se pueden usar potenciadores de absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana que controla la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

Entrega pasiva transdérmica del fármaco

45 Unas variedades de tipos de parches transdérmicos encontrarán uso en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede preparar un parche adhesivo simple a partir de un material de soporte y un adhesivo de acrilato. El complejo agente farmacéutico-modificador químico y cualquier potenciador se formulan en la disolución de colada adhesiva y se dejan mezclar bien. La solución se vierte directamente sobre el material de soporte y el disolvente de colada se evapora en un horno, dejando una película adhesiva. El revestimiento desprendible puede fijarse para completar el sistema.

50 Alternativamente, se puede emplear un parche de matriz de poliuretano para administrar el complejo agente farmacéutico-modificador químico. Las capas de este parche comprenden un soporte, una matriz de fármaco/potenciador de poliuretano, una membrana, un adhesivo y un revestimiento desprendible. La matriz de poliuretano se prepara utilizando un prepolímero de poliuretano de curado a temperatura ambiente. La adición de agua, alcohol y complejo al prepolímero da como resultado la formación de un elastómero firme adhesivo que se puede moldear directamente sólo al material de soporte.

60 Una realización adicional de esta invención utilizará un parche de matriz de hidrogel. Típicamente, la matriz de hidrogel comprenderá alcohol, agua, fármaco y varios polímeros hidrofílicos. Esta matriz de hidrogel puede incorporarse en un parche transdérmico entre el soporte y la capa adhesiva.

65 Para los sistemas de administración pasiva, la velocidad de liberación se controla típicamente mediante una membrana colocada entre el depósito y la piel, por difusión desde un dispositivo monolítico o por la propia piel que sirve como una barrera de control de la velocidad en el sistema de administración (véanse las patentes estadounidenses Nos. 4.816.258, 4.927.408, 4.904.475, 4.588.580, 4.788.062). La velocidad de suministro del fármaco dependerá, en parte, de la naturaleza de la membrana. Por ejemplo, la velocidad de suministro del

fármaco a través de las membranas dentro del cuerpo es generalmente mayor que a través de las barreras dérmicas. La velocidad a la que se administra el complejo desde el dispositivo a la membrana se controla más ventajosamente mediante el uso de membranas limitadoras de velocidad que se colocan entre el depósito y la piel. Asumiendo que la piel es suficientemente permeable al complejo (es decir, la absorción a través de la piel es mayor que la velocidad de paso a través de la membrana), la membrana servirá para controlar la velocidad de dosificación experimentada por el paciente.

Los materiales de membrana permeables adecuados se pueden seleccionar con base en el grado deseado de permeabilidad, la naturaleza del complejo y las consideraciones mecánicas relacionadas con la construcción del dispositivo. Los ejemplos de materiales de membrana permeables incluyen una amplia variedad de polímeros naturales y sintéticos, tales como polidimetilsiloxanos (cauchos de silicona), copolímero de acetato de vinil etileno (EVA), poliuretanos, copolímeros de poliuretano-poliéter, polietilenos, poliamidas, cloruro de polivinilo (PVC), polipropilenos, policarbonatos, politetrafluoroetilenos PTFE), materiales celulósicos, por ejemplo, triacetato de celulosa y nitrato/acetato de celulosa, e hidrogeles, por ejemplo, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA).

Otros elementos pueden estar contenidos en el dispositivo, tales como otros componentes convencionales de productos terapéuticos, dependiendo de las características deseadas del dispositivo. Por ejemplo, las composiciones de acuerdo con esta invención también pueden incluir uno o más conservantes o agentes bacteriostáticos, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, clorocresol, cloruros de benzalconio y similares. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener otros ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, particularmente antibióticos, anestésicos, analgésicos y agentes antiprurífticos.

Tratamientos tópicos

Otro aspecto de esta invención se refiere a la administración tópica de composiciones farmacéuticas. Este régimen de tratamiento es adecuado tanto para la administración sistémica del agente farmacéutico como para el tratamiento localizado, es decir, directamente al tejido patológico o enfermo.

Típicamente, las formulaciones tópicas comprenderán una preparación para suministrar el complejo agente farmacéutico-modificador químico directamente a la piel afectada que comprende el complejo, típicamente en concentraciones en el intervalo de aproximadamente 0,001% a 10%; preferiblemente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10%; más preferiblemente, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5%; y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5%, junto con un portador tópico farmacéuticamente aceptable no tóxico (véase *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*, Barry (ed.), Marcel Dekker Inc., (1983); para dosificaciones estándar de los agentes farmacéuticos convencionales, véase, por ejemplo, *Physicians Desk Reference* (Edición de 1992) y la Asociación Médica Americana (1992) *Drug Evaluations Subscriptions*).

Las preparaciones tópicas se pueden preparar combinando el complejo agente farmacéutico-modificador químico con diluyentes farmacéuticos convencionales y vehículos habitualmente usados en formulaciones tópicas secas, líquidas, en crema y aerosoles. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Tales bases pueden incluir agua y/o un aceite tal como parafina líquida o un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete o aceite de ricino. Los agentes espesantes que se pueden usar según la naturaleza de la base incluyen parafina blanda, estearato de aluminio, alcohol cetosteárilico, propilenglicol, polietilenglicoles, grasa de lana, lanolina hidrogenada, cera de abejas y similares. Las lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y, en general, también incluirán uno o más de los siguientes: agentes estabilizantes, emulsionantes, dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes colorantes, perfumes y similares. Los polvos pueden formarse con la ayuda de cualquier base en polvo adecuada, por ejemplo, talco, lactosa, almidón y similares. Las gotas se pueden formular con una base acuosa o una base no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes y similares.

Las formas de dosificación para la administración tópica de un complejo de esta invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, reguladores o propelentes que puedan ser requeridos.

Los ungüentos, pastas, cremas y geles también pueden contener excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, talco y óxido de zinc o mezclas de los mismos. Los polvos y aerosoles también pueden contener excipientes tales como lactosa, talco, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Suministro transmucosal

Aunque la mayor parte de la discusión en la presente memoria se ha centrado en técnicas para el suministro transdérmico, los métodos de la presente invención también son aplicables al transporte y suministro mejorados de agentes farmacéuticos a través de membranas mucosas, tales como las membranas gastrointestinal, sublingual, bucal, nasal, pulmonar, vaginal, corneal y ocular (véase Mackay et al. (1991) Adv. Drug Del. Rev, 7: 313-338). Específicamente, hay muchas similitudes entre la piel y las membranas mucosas. Por ejemplo, la membrana de la cavidad bucal no está queratinizada. Sin embargo, la membrana bucal es similar a la piel porque ambas están estratificadas con la primera constituida por células poligonales en la membrana basal que conduce a células escamosas en la superficie.

El suministro de fármaco transmucosal (es decir, sublingual, bucal y vaginal) proporciona una entrada eficiente de sustancias activas a la circulación sistémica y reduce el metabolismo inmediato por el hígado y la flora de la pared intestinal. Las formas de dosificación de fármacos transmucosales (por ejemplo, comprimido, supositorio, ungüento, gel, pesario, membrana y polvo) se mantienen típicamente en contacto con la membrana mucosa y se desintegran y/o se disuelven rápidamente para permitir la absorción sistémica inmediata.

Administración Bucal

Para la administración a las membranas bucales o sublinguales, se usará típicamente una formulación oral, tal como una pastilla, comprimido o cápsula. El método de fabricación de estas formulaciones se conoce en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la adición del complejo agente farmacéutico-modificador químico a un comprimido prefabricado; compresión en frío de un relleno inerte, un aglutinante y un complejo agente farmacéutico-modificador químico o una sustancia que contiene el complejo (tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4.806.356) y encapsulación.

Otra formulación oral es una que puede aplicarse con un adhesivo, tal como el derivado de celulosa, hidroxipropilcelulosa, a la mucosa oral, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4.940.587. Esta formulación adhesiva bucal, cuando se aplica a la mucosa bucal, permite la liberación controlada del complejo agente farmacéutico-modificador químico en la boca y a través de la mucosa bucal.

Administración nasal/pulmonar

Para la administración a las membranas nasal y/o pulmonar, se empleará típicamente una formulación en aerosol. El término "aerosol" incluye cualquier fase suspendida en el gas del complejo agente farmacéutico-modificador químico que es capaz de inhalarse en los bronquiolos o pasajes nasales. Específicamente, el aerosol incluye una suspensión de gotitas de los compuestos de la presente invención transportada por gas, tal como se puede producir en un inhalador de dosis medida o nebulizador, o en un atomizador de neblina. El aerosol también incluye una composición en polvo seco del complejo agente farmacéutico-modificador químico suspendido en aire u otro gas portador, que puede ser suministrado por inhalación desde un dispositivo inhalador.

Suministro a través de la barrera hematoencefálica

La presente invención también se puede usar para transportar agentes farmacéuticos o de formación de imágenes a través de la barrera hematoencefálica. Los liposomas que contienen saposina C (o una variante o péptido del mismo) y un lípido de cadena larga cargado negativamente tal como DOPS se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa, intraocular o transnasal para su administración al SNC, específicamente el cerebro, usando métodos como se describen en la técnica. La administración a través de la cavidad nasal, por ejemplo, da como resultado la entrada en el FCE olfatorio y luego en el torrente sanguíneo periférico similar a una infusión intracerebroventricular (ICV). Tal como se describió completamente anteriormente, los expertos en la técnica deben entender que se pueden incluir otros lípidos de cadena larga neutros y/o lípidos de cadena corta (neutros o negativos) en la composición del liposoma como se ha descrito anteriormente para mejorar la estabilidad o utilidad de la composición final.

Como ejemplo de transporte exitoso en el SNC, el inventor ha demostrado que la saposina C puede ser transportada a las neuronas corticales y del hipocampo de ratón cultivadas, facilitadas por complejos con liposomas DOPS. La saposina C se puede transportar a compartimentos endosómicos y lisosómicos usando liposomas de saposina C que contienen fosfolípidos aniónicos de cadena larga. Este método puede usarse para el tratamiento de enfermedades neurológicas incluyendo, por ejemplo, aquellas en las que la acumulación de MVB contribuye a la patología y la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en ratones PSAP^{-/-}, en los que se encuentra formación de MVB en neuronas y tejidos cerebrales, la administración de los liposomas de DOPS-saposina C a través de inyección en la cola dio como resultado una reducción de la acumulación de estas estructuras. Véanse las Figuras 5 y 7.

En otra realización, se conjugan una serie de agentes dirigidos a la barrera hematoencefálica con la superficie del liposoma. Los agentes de direccionamiento adecuados incluyen insulina, transferrina, factor de crecimiento similar a la insulina o leptina, ya que estos péptidos tienen todos sistemas RMT endógenos dentro de la BBB que también existen en la BCM, y estos péptidos endógenos podrían ser usados como "péptidos transportables".

5 Alternativamente, la superficie del liposoma podría conjugarse con 2 "péptidos transportables" diferentes, un péptido dirigido a un receptor endógeno de BBB y el otro dirigido a un péptido endógeno de BCM. Este último podría ser específicos para células particulares dentro del cerebro, tales como neuronas, células gliales, pericitos, células de músculo liso o microglia. Los péptidos dirigidos pueden ser ligandos peptídicos endógenos de los receptores, análogos del ligando endógeno o MAb peptidomiméticos que se unen al mismo receptor del ligando endógeno. El uso de anticuerpos monoclonales peptidomiméticos específicos para receptores de transferrina (TfR) como "péptidos transportables" a la BBB se describen en detalle en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.154.924; 5.182.107; 5.527.527; 5.672.683; 5.833.988; y 5.97.307. Se ha descrito el uso de un MAb para el receptor de insulina humana (HIR) como un "péptido transportable" a la BBB.

15 Los agentes de conjugación que se usan para conjugar los agentes de direccionamiento a la barrera hematoencefálica con la superficie del liposoma pueden ser cualquiera de los agentes de conjugación poliméricos bien conocidos tales como esfingomielina, polietilenglicol (PEG) u otros polímeros orgánicos. En una realización, PEG es el agente de conjugación. En una realización, el peso molecular del agente de conjugación está entre 1.000 y 50.000 DA. En una realización, el agente de conjugación es un PEG bifuncional de 2.000 DA que contiene un lípido en un extremo y un grupo maleimida en el otro extremo. El extremo lipídico del PEG se une a la superficie del liposoma con el grupo maleimida uniéndose al anticuerpo monoclonal específico del receptor u otro vehículo de direccionamiento a la barrera hematoencefálica. En una realización, se conjugan de 5 a 1.000 vehículos dirigidos a cada liposoma. En una realización se proporcionan liposomas que tienen aproximadamente 25-40 vehículos de direccionamiento conjugados con los mismos.

Aunque la invención se ha descrito utilizando liposomas como el nanocontenedor preferido, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden usar otros nanocontenedores. Por ejemplo, el liposoma puede ser reemplazado por una nanopartícula o cualquier otro nanocontenedor molecular con un diámetro <200 nm que pueda encapsular el ADN y proteger el ácido nucleico de las nucleasas mientras que la formulación está todavía en la sangre o en tránsito desde la sangre al compartimiento intracelular de la célula objetivo. También, las cadenas de PEG pueden ser reemplazadas con otras múltiples sustancias poliméricas tales como esfingomielina, que están unidas a la superficie del liposoma o nanocontenedor y sirven al doble propósito de proporcionar una estructura para la conjugación del "péptido transportable" y para retrasar la eliminación de la formulación de la sangre y optimizar la farmacocinética plasmática. Además, la presente invención contempla la administración de genes a cualquier grupo de células u órganos que tengan receptores objetivos específicos.

Tratamiento de la enfermedad de Gaucher con proteínas y polipéptidos fusogénicos de saposina

40 Además, la saposina C es esencial para la hidrólisis de glucosilceramidas en ceramida *in vivo*. Una deficiencia en glucocerebrosidasa epidérmica da lugar a una relación alterada de glucosilceramida con respecto a la ceramida y esta relación alterada se asocia con anomalías de barrera cutánea caracterizadas por la enfermedad de Gaucher. Se cree que la saposina C es crítica para la formación de la barrera de permeabilidad epidérmica mediante el mantenimiento de concentraciones fisiológicas de glucosilceramida y ceramida en el estrato córneo.

45 De acuerdo con este modelo, el papel de la saposina C en la estimulación de la glucocerebrosidasa está mediada por su efecto desestabilizador sobre las membranas. Por lo tanto, en pacientes con deficiencia de glucocerebrosidasa epidérmica, una aplicación tópica de un complejo de saposina C-liposoma, en el que el liposoma contiene beta-glucosidasa ácida, se puede usar la mezcla contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable para fundir membranas celulares con el fin de facilitar la hidrólisis de glucosilceramida a ceramida para ayudar en la regulación de la formación y función de la barrera de la piel. Estas composiciones pueden, por ejemplo, formularse como cremas, lociones, soluciones o geles. El vehículo puede incluir, por ejemplo, agentes emolientes, emulsionantes, espesantes, disolventes, conservantes, colorantes y fragancias, farmacéuticamente aceptables.

55 Los lisosomas de saposina C como sistema de administración de agentes de formación de imágenes

60 En otra realización de la presente invención, el liposoma que contiene saposina C puede utilizarse para suministrar simultáneamente al menos un agente de formación de imágenes que tiene una o más propiedades de formación de imágenes distintas. Estos agentes pueden utilizar formación de imágenes de resonancia magnética, fluorescencia o propiedades de detección de CT/PET. Uno o más agentes de formación de imágenes pueden integrarse o encapsularse simultáneamente en los liposomas que contienen saposina C, de tal manera que se pueda utilizar una única población de liposomas que contienen saposina C para suministrar múltiples agentes de formación de imágenes, con o sin un agente farmacéutico, a los tejidos deseados.

65

En una realización adicional de la presente invención, el medio de contraste basado en liposomas de la invención puede comprender adicionalmente agentes de contraste adicionales tales como agentes de contraste convencionales, que pueden servir para aumentar la eficacia del medio de contraste para IRM. Muchos de tales agentes de contraste son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen agentes de contraste paramagnéticos y superparamagnéticos.

Los ejemplos de agentes de contraste paramagnéticos adecuados para su uso en la presente invención incluyen radicales libres estables (tales como, por ejemplo, nitróxidos estables), así como compuestos que comprenden elementos de transición, lantánidos y actínidos, que pueden, si se desea, estar en la forma de una sal o pueden estar unidos de forma covalente o no covalente a agentes complejantes (incluyendo sus derivados lipofílicos) o a macromoléculas proteínicas.

Los elementos de transición preferidos, lantánidos y actínidos incluyen Gd (III), Mn (II), Cu (II), Cr (III), Fe (II), Fe (III), Ni (II), Eu (III) y Dy (III). Más preferiblemente, los elementos incluyen Gd (III), Mn (II), Cu (II), Fe (II), Fe (III), Eu (III) y Dy (III), especialmente Mn (II) y Gd (III).

Si se desea, estos elementos pueden estar en forma de una sal, tal como una sal de manganeso, por ejemplo, cloruro de manganeso, carbonato de manganeso, acetato de manganeso y sales orgánicas de manganeso, tales como gluconato de manganeso e hidroxilapatita de manganeso; y tal como una sal de hierro, por ejemplo, sulfuros de hierro y sales férricas tales como cloruro férrico.

Estos elementos pueden también, si se desea, estar unidos, por ejemplo, en forma covalente o no covalente, a agentes complejantes (incluyendo sus derivados lipofílicos) o a macromoléculas proteínicas. Los agentes complejantes preferibles incluyen, por ejemplo, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N',N',N"-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N"-triacético (DO3A), ácido 3,6,9-triaza-12-oxa-3,6,9-tricarboximetileno-10-carboxi-13-fenil-tridecanoico (B-19036), ácido hidroxibencililén-diamino-diacético (HBED), N,N'-bis(piridoxil-5-fosfato)etilendiamina, N,N'-diacetato (DPDP), ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N"-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N',N"-tetraacético (TETA), criptandos (es decir, complejos macrocíclicos), y desferrioxamina. Más preferiblemente, los agentes complejantes son EDTA, DTPA, DOTA, DO3A y criptandos, más preferiblemente DTPA. Los complejos lipofílicos preferidos de los mismos incluyen derivados alquilados de los agentes formadores de complejos EDTA, DOTA, etc., por ejemplo, EDTA-DDP, es decir, N,N'-bis-(carboxi-decilamidometil-N-2,3-dihidroxipropil)-etilendiamina-N,N'-diacetato; EDTA-ODP, es decir, N,N'-bis-(carboxioctadecilamido-metil-N-2,3-dihidroxipropil)-etilendiamina-N,N'-diacetato; EDTA-LDP, es decir, N,N'-bis-(carboxilaurilamidometil-N-2,3-dihidroxipropil)-etilendiamina-N,N'-diacetato, etc.; tales como los descritos en el documento US N.º. 887.290, presentado el 22 de mayo de 1992, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las macromoléculas proteínicas preferibles incluyen albúmina, colágeno, poliarginina, polilisina, polihistidina, gamma-globulina y beta-globulina. Más preferiblemente, las macromoléculas proteínicas comprenden albúmina, poliarginina, polilisina y polihistidina.

Los complejos adecuados incluyen, por tanto, Mn (II)-DTPA, Mn (II)-EDTA, Mn (II)-DOTA, Mn (II)-DO3A, Mn (II) -criptandos, Gd (III)-DTPA, Gd (III)-DTAA, Gd (III)-DO3A, Cr (III)-EDTA, Cu (II)-EDTA o hierro-desferrioxamina, especialmente Mn (II)-DTPA o Gd (III)-DTPA.

Los nitróxidos son agentes de contraste paramagnéticos que aumentan las tasas de relajación T1 y T2 en virtud de un electrón no emparejado en la molécula de nitróxido. La eficacia paramagnética de un compuesto dado como agente de contraste de IRM está al menos parcialmente relacionada con el número de electrones no emparejados en el núcleo o molécula paramagnética, específicamente con el cuadrado del número de electrones no apareados. Por ejemplo, el gadolinio tiene siete electrones no apareados y una molécula de nitróxido tiene sólo un electrón no apareado; por lo que el gadolinio es generalmente un agente de contraste de IRM mucho más fuerte que un nitróxido. Sin embargo, el tiempo de correlación efectivo, otro parámetro importante para evaluar la efectividad de los agentes de contraste, confiere una capacidad de relajación potencial a los nitróxidos.

Cuando el tiempo de correlación efectivo es muy cercano a la frecuencia de Larmor del protón, la velocidad de relajación puede aumentar dramáticamente. Cuando la velocidad de caída es retardada, por ejemplo, uniendo el agente de contraste paramagnético a una estructura grande, ésta caerá más lentamente y, de este modo, transferirá más eficazmente energía para acelerar la relajación de los protones del agua. En el gadolinio, sin embargo, el tiempo de relajación del espín del electrón es rápido y limitará la extensión a la que los tiempos de correlación de rotación lentos pueden aumentar la relajación. Sin embargo, para los nitróxidos, los tiempos de correlación del espín del electrón son más favorables y se pueden lograr enormes incrementos en la relajación al disminuir el tiempo de correlación rotacional de estas moléculas. Los liposomas de la presente invención son ideales para alcanzar los objetivos de tiempos de correlación rotacional retardados y la mejora resultante en la relajación. Aunque no se pretende estar limitado por ninguna teoría particular de funcionamiento, se contempla que, puesto que los nitróxidos pueden estar diseñados para recubrir los perímetros de los liposomas, por ejemplo, haciendo derivados de alquilo de los mismos, que pueden optimizar los tiempos de correlación

resultantes. Además, el medio de contraste resultante de la presente invención puede ser visto como una esfera magnética, una configuración geométrica que maximiza la relajación.

5 Si se desea, los nitroxidos se pueden alquilar o bien formar derivados, tales como los nitroxidos 2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi, radical libre, y 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi, radical libre (TMPO).

10 Los ejemplos de agentes de contraste superparamagnéticos adecuados para su uso en la presente invención incluyen óxidos metálicos y sulfuros que experimentan un dominio magnético, compuestos ferro o ferrimagnéticos, tales como hierro puro, óxido de hierro magnético (tal como magnetita), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferrita de manganeso, ferrita de cobalto y ferrita de níquel.

15 Los agentes de contraste, tales como los agentes de contraste paramagnéticos y superparamagnéticos descritos anteriormente, pueden emplearse como un componente dentro de las microesferas o en el medio de contraste que comprende las microesferas. Pueden estar atrapados dentro del espacio interno de las microesferas, administrados como una solución con las microesferas o incorporados en el compuesto estabilizador que forma la pared de las microesferas.

20 Por ejemplo, si se desea, los agentes paramagnéticos o superparamagnéticos se pueden suministrar como derivados alquilados u otros derivados incorporados en el compuesto estabilizante, especialmente las paredes lipídicas de las microesferas. En particular, los nitroxidos 2,2,5,5-tetrametil-1-pirrolidiniloxi, radical libre y 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi, radical libre pueden formar aductos con ácidos grasos de cadena larga en las posiciones del anillo que no están ocupados por los grupos metilo, a través de un número de enlaces diferentes, por ejemplo, un grupo acetiloxi. Tales aductos son muy susceptibles de incorporación en los compuestos estabilizantes, especialmente aquellos de naturaleza lipídica, que forman las paredes de las microesferas de la
25 presente invención.

De forma similar pueden utilizarse mezclas de uno o más de los agentes paramagnéticos y/o agentes superparamagnéticos en el medio de contraste.

30 Los agentes paramagnéticos y superparamagnéticos descritos anteriormente también pueden coadministrarse por separado, si se desea.

35 Los liposomas usados en la presente invención pueden no sólo servir como portadores eficaces de los agentes superparamagnéticos, por ejemplo, óxidos de hierro, sino que también parecen magnificar el efecto de los agentes de contraste de susceptibilidad. Los agentes de contraste superparamagnéticos incluyen óxidos metálicos, particularmente óxidos de hierro, pero que incluyen óxidos de manganeso, y como óxidos de hierro, que contienen cantidades variables de manganeso, cobalto y níquel que experimentan un dominio magnético.

40 Estos agentes son nano o micropartículas y tienen susceptibilidades a granel muy altas y velocidades transversales de relajación. Las partículas más grandes, por ejemplo, de 100 nm de diámetro, tienen relajaciones R2 mucho mayores que las relajaciones R1, pero las partículas más pequeñas, por ejemplo, de 10 a 15 nm de diámetro tienen relajaciones R2 algo más bajas, pero valores R1 y R2 mucho más equilibrados. Las partículas más pequeñas, por ejemplo, partículas de óxido de hierro monocristalinas, de 3 a 5 nm de diámetro, tienen relajaciones R2 inferiores, pero probablemente las velocidades de relajación R1 y R2 más equilibradas. La ferritina también puede formularse para encapsular un núcleo de hierro superparamagnético de velocidad de relajación muy alta. Se ha descubierto que los liposomas estabilizados usados en la presente invención pueden aumentar la eficacia y la seguridad de estos agentes de contraste de IRM convencionales con base en óxido de hierro.

50 La incorporación de agentes de formación de imágenes en liposomas es ventajosa para determinar la captación y suministro del agente farmacéutico contenido en la misma. Además, tales agentes también pueden permitir la formación de imágenes de estructura de tejido, o en el caso de cánceres, el grado de metástasis o crecimiento tumoral. En una realización de la presente invención, los liposomas que contienen saposina-C pueden transferir agentes farmacéuticos y de formación de imágenes a través de membranas biológicas. En otra realización, se
55 pueden incorporar múltiples agentes de formación de imágenes en la membrana liposomal, o pueden usarse agentes de formación de imágenes que tienen múltiples propiedades de formación de imágenes (tales como los agentes PTIR descritos anteriormente y en los Ejemplos). Cualquiera de los dos métodos permite al médico o investigador utilizar múltiples métodos de detección con una única administración de la composición liposomal.

60 Los agentes de formación de imágenes pueden utilizar imágenes de resonancia magnética, fluorescencia o dispositivos PT/CAT. El uso de agentes potenciadores de contraste de formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) o isótopos radiactivos en el cuerpo se practica mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, Li, et al., patente de los Estados Unidos No. 6.569.451, enseña un método mediante el cual se pueden usar partículas de liposomas polimerizadas para administrar agentes de contraste tales como las que utilizan
65 formación de imágenes de resonancia magnética.

En una realización de la presente invención, se pueden encapsular agentes de contraste de RM (tales como nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas ultrapequeñas (USPIO)) dentro del interior acuoso del liposoma. El barrido por IRM puede emplear quelatos de gadolinio o manganeso. Sin embargo, la marcación de células no fagocíticas para la detección de RM requiere que los liposomas encapsulen y entreguen cantidades
 5 suficientes del agente de contraste. Se pueden usar liposomas específicos de tumores para administrar el agente al tejido, ayudando a la detección temprana y mejor visualización usando IRM. La administración y absorción de fármacos dirigidos también se pueden estimar usando microimágenes de RM mejoradas de contraste, usando liposomas de la presente invención como portadores duales para el fármaco y el agente de contraste. Por ejemplo, COMBIDEX (Advanced Magnetics, MA, tamaño de 0 nm), un agente de formación de imágenes
 10 moleculares detectado usando IRM, puede encapsularse en liposomas hechos de dioleilfosfatidilserina (DOPS). Estos liposomas pueden ser entonces administrados eficazmente a células de neuroblastoma humano. Esto se describe con detalle en el Ejemplo 3 de la presente invención.

Si se desea, se pueden usar dos o más iones diferentes en combinación. Como los expertos en la técnica reconocerán, una vez armados con la presente descripción, pueden usarse diversas combinaciones de los compuestos liposolubles y los iones paramagnéticos para modificar el comportamiento de relajación del agente de contraste resultante. Se ha encontrado que los complejos de compuestos de iones paramagnéticos y liposolubles objeto de la invención son agentes de mejora de contraste extremadamente eficaces para la
 15 formación de imágenes de resonancia magnética.

Los compuestos liposolubles de la presente invención se pueden emplear solos o en combinación y en combinación con uno o más iones paramagnéticos como agentes de contraste para la formación de imágenes de resonancia magnética. Ejemplos de iones paramagnéticos incluyen iones de transición, lantánidos (tierras raras) y actínidos, como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica, en vista de la presente descripción.
 20 Los iones paramagnéticos preferidos incluyen los seleccionados del grupo que consiste en Cr³, Co², Mn², Ni², Fe³, Fe², La³, Cu², Gd³, Ce³, Tb³, Pr³, Dy³, Nd³, Ho³, Pm³, Er³, Sm³, Tm³, Eu³, Yb³ y Lu³. Más preferiblemente, el ion paramagnético se selecciona del grupo que consiste en Mn², Fe³ y Gd³, lo más preferiblemente Mn².

Existen múltiples agentes de contraste para mejorar el contraste tisular en la formación de imágenes de resonancia magnética. Algunos de los agentes de contraste más comúnmente usados son quelatos de gadolinio, tales como Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA y Gd-DOTA. La mayoría de las formulaciones de agente de contraste actualmente disponibles son de pequeño tamaño molecular. En una realización, el agente de contraste se
 30 selecciona del grupo que consiste en yodo, gadolinio y magnetita.

Adicionalmente, se pueden incorporar agentes de formación de imágenes fluorescentes dentro de los liposomas de la presente invención, proporcionando así un medio adicional de detección. Por ejemplo, pueden utilizarse NBD, rodamina, los marcadores PTIR descritos anteriormente, u otros agentes fluorescentes conocidos. Cualquier marca fluorescente comercialmente disponible o colorante marcado fluorescentemente (ya sea lipófilo
 40 o que contenga una fracción lipofílica) tal como los descritos anteriormente se puede usar con la presente invención. Hui, L. et al., describe métodos en donde los agentes de contraste de PTIR pueden usarse para marcar las partículas de LDL, y se incorpora aquí como referencia. Hui, L. et al., MR and Fluorescent Imaging of Low Density Lipoprotein Receptors, Acad Radiol 2004; 11:1251-1259. La concentración total del agente fluorescente en la composición lipídica es de aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5% o
 45 aproximadamente 2% hasta aproximadamente 4%. De los agentes fluorescentes, los marcadores que emiten longitudes de onda más largas (fluorescencia roja) tales como PTIR 271 y 316 producen menos fondo *in vivo*. Las longitudes de onda azul y verde tienen mayor señal de fondo. Se ha sido demostrado por los inventores que PTIR 271 se incorpora en liposomas que contienen saposina-C con fondo mínimo y una señal claramente detectable. La Figura 7 ilustra la captación de liposomas DOPS que contienen PTIR 271 y 316.
 50

Los compuestos líquidos que contienen yodo, adecuadamente derivados de yodo o poliyodofenilo se usan como agentes de contraste que contienen yodo. Los materiales adecuados incluyen lopromida, loxitalamato, loxaglato, lopamidol, lohexol, lotralon, Metrizamida o Ultravist. Al mismo tiempo, el agente de contraste sirve como disolvente para la mezcla de los liofilizados. Se emplean agentes de contraste que contienen gadolinio o
 55 magnetita para la tomografía de resonancia magnética (TRM). Adecuadamente, de 30 mg a 90 mg de partículas liofilizadas se mezclan en las cantidades requeridas de fármaco citostático y posteriormente se disuelven en 3 mL a 6 mL de agente de contraste.

La nueva preparación y su uso permiten sin la ayuda de métodos indirectos, usar fluoroscopia de rayos X, una embolización suficiente que se retrata directamente, siendo formada la imagen del tumor con sus vasos sanguíneos como una imagen fija; utilizando fármacos de contraste que contienen gadolinio o magnetita en combinación con secuencias de medida codificadas por flujo, y la embolización también se puede representar con la ayuda de tomografía de resonancia magnética.; la concentración alcanzable de fármacos citostáticos en el
 60 tejido tumoral aumenta considerablemente (hasta un factor de 20) en comparación con otras formas de administración; y la aplicación se simplifica mientras, al mismo tiempo, aumenta la seguridad (se evita la perfusión retrógrada defectuosa).
 65

Finalmente, pueden usarse agentes de formación de imágenes que utilizan tomografía computarizada (barrido de CT) o tomografía por emisión de positrones (PET). Los agentes de formación de imágenes de radionúclidos más empleados incluyen yodo e indio radiactivos. La formación de imágenes por barrido de CT puede emplear un metal pesado tal como quelatos de hierro. Además, la tomografía de emisión de positrones (PET) puede ser posible utilizando emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio. Ejemplos de radionúclidos útiles en procedimientos de formación de imágenes incluyen: ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , ^{81}Kr , ^{87}Sr , ^{99}c , ^{111}In , ^{113}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi . Estos agentes de formación de imágenes detectables por CT/PET pueden incorporarse en el liposoma de saposina-C usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Un experto en la materia puede conjugar un polipéptido de saposina-C con un radionúclido usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; y Barchel, S. W. y Rhodes, B. H., (1983) *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, Nueva York, N.Y., cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia, enseñan la conjugación de varios radionucleidos terapéuticos y de diagnóstico con aminoácidos de anticuerpos. Tales reacciones pueden aplicarse a conjugados de radionucleidos con péptidos de saposina-C o con péptidos de saposina-C con un enlazador apropiado.

Marcadores

Las composiciones de esta invención incluyen opcionalmente uno o más marcadores; por ejemplo, marcadores ópticamente detectables, tales como marcadores fluorescentes o luminiscentes, y/o marcadores no ópticamente detectables, tales como marcadores magnéticos. Una cantidad de marcadores fluorescentes son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, puntos cuánticos, fluoróforos hidrófobos (por ejemplo, cumarina, rodamina y fluoresceína) y proteína fluorescente verde (GFP) y sus variantes (por ejemplo, proteína fluorescente cian y proteína fluorescente amarilla). Véase, por ejemplo, Haughland (2002) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Novena edición o la actual edición Web, ambas disponibles a través de Molecular Probes, Inc. Igualmente, se conocen una variedad de combinaciones donador/aceptor y fluoróforo/detenedor usando, por ejemplo, detenedor con base en transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), detención no basada en FRET o moléculas de recolección con cambio de longitud de onda. Ejemplos de combinaciones incluyen proteína fluorescente cian y proteína fluorescente amarilla, quelato de terbio y quelatos de TRITC (isotiocianato de tetra-rodamina de lantánido (por ejemplo, europio o terbio) y alofococianina (APC) o Cy5, criptato de europio y Alofococianina, fluoresceína y tetrametilrodamina, IAEDANS y fluoresceína, EDANS y DABCYL, fluoresceína y DABCYL, fluoresceína y fluoresceína, BODIPY FL y BODIPY FL, y fluoresceína y colorante QSY7. Los aceptores no fluorescentes tales como los colorantes DABCYL y QSY 7 y QSY 33 tienen la ventaja particular de eliminar la fluorescencia de fondo resultante de la excitación directa del aceptor (es decir, no sensibilizada). Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos 5.668.648, 5.707.804, 5.728.528, 5.853.992 y 5.869.255 de Mathies et al., para una descripción de colorantes FRET.

Para el uso de puntos cuánticos como marcadores para biomoléculas, véase, por ejemplo, Dubertret et al., (2002) *Science* 298: 1759; *Nature Biotechnology* (2003) 21: 41-46; y *Nature Biotechnology* (2003) 21: 47-51. En el contexto de la presente invención, tales puntos cuánticos pueden usarse para marcar cualquier ácido nucleico de interés, por ejemplo, un ARN de interferencia.

En la invención también se pueden usar otros marcadores ópticamente detectables. Por ejemplo, se pueden usar perlas de oro como marcadores y se pueden detectar usando una fuente de luz blanca a través de la dispersión de la luz de resonancia. Véase, por ejemplo, <http://www.geniconsiences.com>. En la técnica también se conocen marcadores no ópticamente detectables adecuados. Por ejemplo, se pueden usar marcadores magnéticos en la invención (por ejemplo, óxido de hierro coloidal superparamagnético de 3 nm como marcador y detección por RMN, véase, por ejemplo, *Nature Biotechnology* (2002) 20: 816-820).

Los marcadores se pueden introducir en ácidos nucleicos durante la síntesis o mediante reacciones posteriores a la síntesis mediante técnicas establecidas en el arte. Por ejemplo, se puede incorporar un nucleótido marcado en forma fluorescente en un ARN o ADN durante síntesis enzimática o química de los ácidos nucleicos, por ejemplo, en una posición preseleccionada o aleatoria del nucleótido. Alternativamente, se pueden añadir marcadores fluorescentes a los ARN o los ADN mediante reacciones posteriores a la síntesis, ya sea en posiciones aleatorias o preseleccionadas (por ejemplo, un oligonucleótido se puede sintetizar químicamente con una amina terminal o un tiol libre en una posición preseleccionada y un fluoróforo se puede acoplar al oligonucleótido a través de reacción con la amina o el tiol). Los reactivos para marcación fluorescente de ácidos nucleicos están comercialmente disponibles; por ejemplo, están disponibles una variedad de kits para marcación fluorescente de ácidos nucleicos a través de Molecular Probes, Inc. (www.probes.com), y está disponible un kit para marcación aleatoria de ARN bicatenario a través de Ambion, Inc. (www.ambion.com, el kit de marcación de ARNpi Silencer^{MR}). Los detenedores se pueden introducir mediante técnicas análogas.

Se ha descrito la unión de marcadores a oligos durante síntesis automatizada y mediante reacciones posteriores a la síntesis. Véase, por ejemplo, Tyagi y Kramer (1996) "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization" *Nature Biotechnology* 14: 303-308; Patente de los Estados Unidos No. 6.037.130 de Tyagi et al.

(14 de marzo de 2000), titulada "Wavelength-shifting probes and primers and their use in assays and kits"; y la patente de los Estados Unidos No. 5.925.517 (Julio 20, 1999) de Tyagi et al. titulada "Detectably labeled dual conformation oligonucleotide probes, assays and kits". Los detalles adicionales sobre la síntesis de oligos con introducción de grupos funcionales pueden encontrarse en Nelson, et al., (1989) "Bifunctional Oligonucleotide Probes Synthesized Using A Novel CPG Support Are Able To Detect Single Base Pair Mutations" *Nucleic Acids Research* 17: 7187-7194.

Los marcadores y/o detenedores pueden introducirse en los oligonucleótidos, por ejemplo, utilizando una columna de vidrio de poro controlado para introducir, por ejemplo, el detenedor (por ejemplo, una fracción de 4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonilo (DABSYL). Por ejemplo, se puede añadir el detenedor en el extremo 3' de los oligonucleótidos durante la síntesis automatizada; se puede usar un éster de succinimidilo del ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) cuando el sitio de unión es un grupo amino primario; y se puede utilizar 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida (DABMI) cuando el sitio de unión es un grupo sulfhidrilo. De manera similar, se puede introducir fluoresceína en los oligos, ya sea utilizando una fosforamidita de fluoresceína que reemplace un nucleósido con fluoresceína, o bien utilizando una fosforamidita dT de fluoresceína que introduce una fracción de fluoresceína en un anillo de timidina a través de un espaciador. Para enlazar una fracción de fluoresceína a una ubicación terminal, se puede acoplar yodoacetoamidofluoresceína a un grupo sulfhidrilo. Se puede introducir tetraclorofluoresceína (TET) durante la síntesis automatizada usando una fosforamidita de 5'-tetracloro-fluoresceína. Otros derivados de fluoróforo reactivo y sus respectivos sitios de unión incluyen el éster succinimidilo de 5-carboxirodamina-6G (RHD) acoplado a un grupo amino; una yodoacetamida de tetrametilrodamina acoplada a un grupo sulfhidrilo; un isotiocianato de tetrametilrodamina acoplado a un grupo amino; o un cloruro de sulfonilo de rojo Texas acoplado a un grupo sulfhidrilo. Los oligonucleótidos marcados se pueden purificar, si se desea, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento u otros métodos.

De forma similar, se pueden detectar las señales de los marcadores (por ejemplo, absorción por y/o emisión fluorescente a partir de un marcador fluorescente) esencialmente por cualquier método conocido en la técnica.

Por ejemplo, detección multicolor, detección de FRET (incluyendo, por ejemplo, FRET resuelto en el tiempo o TR-FRET, por ejemplo, entre los donantes de quelatos de lantánidos y los aceptores de colorantes fluorescentes, véase, por ejemplo, *Journal of Biomolecular Screening* (2002) 7: 3-10), y similares, que son bien conocidos en la técnica. En resumen, FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) es un fenómeno de transferencia de energía no radioactiva en el que dos fluoróforos con espectros de emisión y excitación superpuestos, cuando están suficientemente próximos, experimentan transferencia de energía por una interacción de dipolo inducido por un dipolo de resonancia. El fenómeno se usa comúnmente para estudiar la unión de analitos tales como ácidos nucleicos, proteínas y similares. FRET es una interacción de estado excitado dependiente de la distancia en la que la emisión de un fluoróforo se acopla a la excitación de otro que está en las cercanías (lo suficientemente cerca para que se produzca un cambio observable en las emisiones). Algunos fluoróforos excitados interactúan para formar excímeros, que son dímeros de estado excitado que exhiben espectros de emisión alterados (por ejemplo, análogos de fosfolípidos con cadenas acilo sn-2 de pireno); véase, por ejemplo, Haughland (2003) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, novena edición, disponible a través de *Molecular Probes*. Una discusión directa de FRET se puede encontrar en el Manual y las referencias citadas en el mismo.

Como otro ejemplo, se puede usar polarización de fluorescencia. En resumen, en el funcionamiento de tales ensayos de unión fluorescentes, se usa una molécula típicamente pequeña, marcada fluorescentemente, por ejemplo, un ligando, antígeno, etc., que tiene un tiempo de correlación rotacional relativamente rápido, para unirse a una molécula mucho más grande, por ejemplo, una proteína receptora, anticuerpo, etc., que tiene un tiempo de correlación rotacional mucho más lento. La unión de la molécula pequeña marcada a la molécula más grande aumenta significativamente el tiempo de correlación rotacional (disminuye la cantidad de rotación) de la especie marcada, a saber, el complejo marcado sobre aquel de la molécula marcada libre no unida. Esto tiene un efecto correspondiente en el nivel de polarización que es detectable. Específicamente, el complejo marcado presenta una polarización de fluorescencia mucho más alta que la molécula marcada, no unida.

Como reconocerán los expertos en la técnica, cualquiera de los compuestos lipídicos y preparaciones que contienen los compuestos lipídicos (incluyendo las preparaciones de lípido y de agente de contraste) pueden ser liofilizado para su almacenamiento y reconstituidos en, por ejemplo, un medio acuoso tal como agua estéril o solución salina regulada con fosfato), con la ayuda de agitación vigorosa. Con el fin de evitar la aglutinación o fusión de los lípidos como resultado de la liofilización, puede ser útil incluir aditivos en la formulación para evitar dicha fusión o aglutinación. Los aditivos que pueden ser útiles incluyen sorbitol, manitol, cloruro sódico, glucosa, trehalosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol (tal como PEG 400). Estos y otros aditivos se describen en la literatura, tal como en la Farmacopea de los Estados Unidos, USP XXII, NF XVII, Farmacopea de los Estados Unidos, The National Formulary, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852. Las preparaciones liofilizadas tienen generalmente la ventaja de una mayor vida útil.

El agente de contraste de la invención puede, además, si se desea, comprender un agente de suspensión. Los agentes de suspensión preferidos incluyen polietilenglicol, lactosa, manitol, sorbitol, alcohol etílico, glicerina,

5 lecitina, monooleato de polioxietilensorbitán, monooleato de sorbitán y albúmina. Como reconocerán los expertos en la técnica, también se pueden emplear diversos azúcares y otros polímeros, tales como polietileno, polivinilpirrolidona, propilenglicol y polioxietileno. La cantidad de agente de contraste de RM acilado paramagnético, por ejemplo, Mn-DDP-EDTA, puede variar de aproximadamente 1 a 75 por ciento en peso de los ingredientes totales usados para formular la emulsión paramagnética del agente de contraste de RM.

10 La presente invención es útil en la formación de imágenes de un paciente en general y/o en el diagnóstico específico de la presencia de tejido enfermo en un paciente. El procedimiento de obtención de imágenes de la presente invención puede llevarse a cabo mediante la administración de un medio de contraste de la invención a un paciente y luego escanear al paciente utilizando imágenes de resonancia magnética para obtener imágenes visibles de una región interna de un paciente y/o de cualquier tejido enfermo en esa región. Por región de un paciente, se entiende todo el paciente, o un área o porción particular del paciente.

15 Cualquiera de los diversos tipos de dispositivos de formación de imágenes de resonancia magnética puede emplearse en la práctica de la invención, no siendo el tipo o modelo particular del dispositivo crítico para el método de la invención. Las técnicas de formación de imágenes por resonancia magnética que se emplean son convencionales y se describen, por ejemplo, en Kean, D. M., y M. A. Smith, *Magnetic Resonance Imaging: Principles and Applications* (Williams y Wilkins, Baltimore 1986). Las técnicas contempladas de obtención de imágenes de resonancia magnética incluyen, pero no se limitan a, resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de RMN y resonancia de espín de electrones (ESR). La modalidad de formación de imágenes preferida es la RMN.

20 Tal como reconocería un experto en la técnica, la administración del agente de contraste al paciente se puede llevar a cabo de diversas maneras, tales como en forma intravascular, oral, rectal, etc., usando una variedad de formas de dosificación. Preferiblemente, la administración es intravascular. La dosificación útil que se va a administrar y el modo de administración particular variarán dependiendo de la edad, el peso y el animal particular y la región del mismo a escanear, y el agente de contraste particular de la invención que se va a emplear.

25 Típicamente, la dosificación se inicia a niveles más bajos y se aumenta hasta que se consigue el aumento de contraste deseado. A modo de orientación general, normalmente se administra entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 1 g del compuesto liposoluble de la presente invención, y entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 micromoles del ion paramagnético, cada uno por kilogramo de peso corporal del paciente, aunque se pueden emplear cantidades más altas y más bajas. De forma similar, a modo de orientación general, cuando se usan lípidos o agentes de suspensión en la formulación, generalmente se pueden emplear entre 30 aproximadamente 0,5 y aproximadamente 50 por ciento en peso de la formulación completa de cada uno, aunque también se pueden usar cantidades más altas y más bajas.

35 En la realización del método de la presente invención, el agente de contraste se puede usar solo o en combinación con otros agentes diagnósticos, terapéuticos u otros. Tales otros agentes incluyen excipientes tales como materiales saborizantes o colorantes.

40 En una realización, el método es particularmente útil en un ser humano sospechoso de tener una proliferación de una masa celular. También puede utilizarse con otras técnicas y dispositivos de formación de imágenes, como se describe en la presente memoria. La formación de imágenes puede comenzar mediante la administración previa de un fármaco usando una composición similar para determinar el mejor tamaño de liposoma o después de la inyección para seguir la biodistribución de los liposomas que transportan los fármacos. Típicamente, la composición se inyecta en un vaso sanguíneo de un ser humano. La formación de imágenes comprende la formación de imágenes al menos 10 horas después de la inyección de dicha composición o antes. La composición se puede administrar usando un dispositivo seleccionado del grupo que consiste en una inyección de jeringa intravenosa, un catéter, un goteo intravenoso y una inyección de jeringa intraperitoneal. Se puede establecer un intervalo de dosificación de lípidos utilizando métodos conocidos y puede incluir una dosis de 0,10 a 0,5 milimoles de lípido por kilogramo de peso corporal.

45 El suministro específico de liposomas a un tejido objetivo tal como una masa celular proliferante, tejido neoplásico, tejido inflamatorio, tejido inflamado y tejido infectado se puede conseguir seleccionando un tamaño de liposoma apropiado para suministrar un agente terapéutico a dicho tejido objetivo. Por ejemplo, los liposomas con un diámetro medio de 180 nm no pueden acumularse en un tumor sólido; preferiblemente se acumulan liposomas con un diámetro medio de 140 nm en la periferia del mismo tumor sólido, y preferiblemente se acumulan liposomas con un diámetro medio de 110 nm en las porciones periféricas y centrales de ese tumor sólido.

50 En otra realización de la invención, se pueden usar preparaciones de liposomas de diferentes tamaños que portan agentes de formación de imágenes para probar la permeabilidad capilar y el tamaño de poro *in vivo*. Esta información se puede usar para determinar el tamaño óptimo de partícula de los liposomas que portan agentes terapéuticos para el tratamiento de un tipo particular de enfermedad en unos pocos experimentos (por ejemplo, 2-3). Dado que los tumores son biológicamente heterogéneos e incluso el mismo tipo de tumor puede

comportarse de manera diferente entre diferentes pacientes, esta información puede ser muy útil para adaptar el tamaño de los liposomas y para la preparación más ventajosa para el tratamiento de un tipo particular de enfermedad tal como cáncer o tejido inflamatorio. En otra realización, la especificidad de suministro de liposomas a un tejido objetivo puede potenciarse adicionalmente marcando los liposomas con anticuerpos (por ejemplo, agentes terapéuticos) u otros marcadores de tejido. En otra realización, la marcación de anticuerpos puede usarse para conseguir o mejorar la administración intracelular del agente terapéutico.

En una realización, la invención proporciona un método de formación de imágenes que comprende

10 a) administrar a un mamífero que lo requiera una composición, que comprende:

i) una cantidad suficiente de agente de formación de imágenes,

15 ii) un liposoma que comprende una bicapa, una proteína o polipéptido fusogénico y un volumen interior, en el que dicho liposoma está en una cantidad suficiente para permitir el suministro de dicho liposoma a un tejido y dicho liposoma porta el agente de formación de imágenes,

b) formación de imágenes de un tejido del mamífero.

20 En otra realización, la composición utilizada en el método de formación de imágenes comprende además un agente terapéutico en una cantidad terapéutica, en el que dicho liposoma porta dicho agente terapéutico.

La presente invención también proporciona métodos de suministro de fármacos, monitoreo del suministro de fármacos, eliminación de tumores, regresión tumoral, monitoreo del crecimiento tumoral y dosificación de fármacos con base en el suministro en un mamífero. El método de administración de fármacos puede comprender:

a) administrar a un mamífero que lo requiera una composición, que comprende:

30 i) un quelato paramagnético con un ion paramagnético, dicho quelato paramagnético está en una cantidad suficiente para potenciar la formación de imágenes por RMN,

ii) un liposoma que comprende una bicapa, una proteína o polipéptido fusogénico y un volumen interior, en el que dicho liposoma está en una cantidad suficiente para permitir el suministro de dicho liposoma a un tejido y dicho liposoma porta dicho quelato paramagnético,

35

b) formación de imágenes de RMN de un tejido de dicho mamífero.

En otra realización, la composición utilizada en el método de formación de imágenes comprende además un agente terapéutico en una cantidad terapéutica, en el que dicho liposoma porta dicho agente terapéutico.

40

Preferiblemente, la formación de imágenes es cuantitativa y la cantidad de dicho liposoma suministrada a dicho tejido puede estimarse y se calcula la cantidad de fármaco suministrado selectivamente. Estos métodos pueden combinarse con métodos de monitoreo de la masa tisular para evaluar la eficacia terapéutica del método de administración del fármaco y del fármaco. Por ejemplo, se puede realizar la determinación del volumen del tejido con el fin de monitorear el volumen del tejido, para indicar la proliferación del tejido, o para monitorear una reducción en la masa tisular. Tales métodos también se pueden usar para determinar el régimen óptimo de suministro a un tejido patológico particular en un paciente particular.

45

En el caso de aplicaciones de diagnóstico, tales como ultrasonido y CT, se aplica energía, tal como energía ultrasónica, a por lo menos una porción del paciente para tomar imágenes del tejido objetivo. Se obtiene entonces una imagen visible de una región interna del paciente, de manera que se puede determinar la presencia o ausencia de tejido enfermo.

50

El ultrasonido puede usarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos. En el ultrasonido de diagnóstico, se pueden aplicar ondas ultrasónicas o un tren de pulsos de ultrasonido con un transductor. El ultrasonido es generalmente pulsado en lugar de continuo, aunque puede ser continuo, si se desea. Por lo tanto, el ultrasonido de diagnóstico implica generalmente la aplicación de un pulso de ecos, después de lo cual, durante un período de escucha, el transductor de ultrasonido recibe señales reflejadas. Se pueden utilizar armónicos, ultra armónicos o subarmónicos. El modo del segundo armónico puede ser empleado ventajosamente, en el que se recibe la frecuencia $2x$, donde x es la frecuencia incidental. Esto puede servir para disminuir la señal del material de fondo y mejorar la señal desde el transductor usando los medios de contraste dirigidos de la presente invención que pueden dirigirse al sitio deseado, por ejemplo, coágulos sanguíneos. Otras señales de armónicos, tales como señales de armónicos impares, por ejemplo, $3x$ o $5x$, serían recibidas de manera similar usando este método. También se pueden recibir y procesar señales subarmónicas, por ejemplo, $x/2$ y $x/3$, para formar una imagen.

55

60

65

Además del método pulsado, puede aplicarse ultrasonido de onda continua, por ejemplo, Power Doppler. Esto puede ser particularmente útil cuando se emplean vesículas rígidas, por ejemplo, vesículas formuladas a partir de metacrilato de polimetilo. En este caso, se puede hacer que la energía relativamente más alta del Power Doppler haga resonar las vesículas y por lo tanto promueva su ruptura. Esto puede crear emisiones acústicas que pueden estar en el intervalo subarmónico o ultra armónico o, en algunos casos, en la misma frecuencia que el ultrasonido aplicado. Se contempla que habrá un espectro de firmas acústicas liberadas en este proceso y el transductor así empleado puede recibir las emisiones acústicas para detectar, por ejemplo, la presencia de un coágulo. Además, el proceso de rotura de vesículas puede emplearse para transferir energía cinética a la superficie, por ejemplo, de un coágulo para promover la lisis del coágulo. Por lo tanto, se puede lograr una trombólisis terapéutica durante una combinación de ultrasonido diagnóstico y terapéutico. También se puede emplear Doppler espectral. En general, los niveles de energía del ultrasonido de diagnóstico son insuficientes para promover la rotura de vesículas y para facilitar la liberación y la captación celular de los agentes bioactivos. Como se ha indicado anteriormente, el ultrasonido de diagnóstico puede implicar la aplicación de uno o más pulsos de sonido. Las pausas entre pulsos permiten que las señales sonoras reflejadas sean recibidas y analizadas. El número limitado de pulsos utilizados en el ultrasonido de diagnóstico limita la energía efectiva que se suministra al tejido que se está estudiando.

El ultrasonido de energía más alta, por ejemplo, el ultrasonido que es generado por el equipo de ultrasonido terapéutico, es generalmente capaz de causar la ruptura de las especies de vesículas. En general, los dispositivos para ultrasonido terapéutico emplean desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100% de ciclos de trabajo, dependiendo del área de tejido a tratar con el ultrasonido. Las áreas del cuerpo que generalmente se caracterizan por cantidades mayores de masa muscular, por ejemplo, espalda y muslos, así como tejidos altamente vascularizados, tales como tejido del corazón, pueden requerir un ciclo de trabajo más grande, por ejemplo, hasta aproximadamente el 100%.

En el ultrasonido terapéutico, el ultrasonido de ondas continuas se utiliza para suministrar niveles de energía más altos. Para la rotura de vesículas, se prefiere el ultrasonido de onda continua, aunque la energía sonora también puede ser pulsada. Si se utiliza energía sonora pulsada, el sonido generalmente se pulsará en longitudes de tren de eco de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 20 o más pulsos a la vez. Preferiblemente, las longitudes del tren de eco son aproximadamente de 20 pulsos a la vez. Además, la frecuencia del sonido utilizado puede variar desde aproximadamente 0,025 hasta aproximadamente 100 megahercios (MHz). En general, la frecuencia para el ultrasonido terapéutico oscila preferiblemente entre aproximadamente 0,75 y aproximadamente 3 MHz, siendo más preferida desde aproximadamente 1 y aproximadamente 2 MHz. Además, los niveles de energía pueden variar desde aproximadamente 0,5 vatios (W) por centímetro cuadrado (cm^2) hasta aproximadamente 5,0 W/cm^2 , siendo preferidos niveles de energía de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2,5 W/cm^2 . Los niveles de energía para ultrasonidos terapéuticos que implican hipertermia son generalmente de aproximadamente 5 W/cm^2 hasta aproximadamente 50 W/cm^2 . Para vesículas muy pequeñas, por ejemplo, vesículas que tienen un diámetro de menos de aproximadamente 0,5 μm , se prefieren generalmente frecuencias de sonido más altas. Esto se debe a que las vesículas más pequeñas son capaces de absorber la energía sónica más eficazmente a frecuencias más altas de sonido. Cuando se utilizan frecuencias muy altas, por ejemplo, superiores a aproximadamente 10 MHz, la energía sónica generalmente penetrará fluidos y tejidos hasta una profundidad limitada solamente. Por lo tanto, la aplicación externa de la energía sónica puede ser adecuada para la piel y otros tejidos superficiales. Sin embargo, generalmente es necesario para las estructuras profundas enfocar la energía ultrasónica de modo que esté dirigida preferentemente dentro de una zona focal.

Alternativamente, la energía ultrasónica puede aplicarse mediante sondas intersticiales, catéteres de ultrasonido intravascular o catéteres endoluminales. Dichas sondas o catéteres pueden utilizarse, por ejemplo, en el esófago para el diagnóstico y/o tratamiento del carcinoma esofágico. Además de los usos terapéuticos descritos anteriormente, las presentes composiciones se pueden emplear en relación con el carcinoma esofágico o en las arterias coronarias para el tratamiento de la aterosclerosis, así como los usos terapéuticos descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.149.319, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente memoria como referencia, en su totalidad.

Se puede usar un dispositivo de ultrasonido terapéutico que emplea dos frecuencias de ultrasonido. La primera frecuencia puede ser x , y la segunda frecuencia puede ser $2x$. En una forma preferida, el dispositivo estaría diseñado de tal manera que las zonas focales de la primera y segunda frecuencias converjan en una única zona focal. La zona focal del dispositivo puede entonces dirigirse a las composiciones objetivo, por ejemplo, composiciones de vesículas objetivo, dentro del tejido objetivo. Este dispositivo de ultrasonido puede proporcionar una segunda terapia de armónicos con aplicación simultánea de las frecuencias x y $2x$ de la energía ultrasónica. Se contempla que, en el caso de ultrasonidos que impliquen vesículas, esta segunda terapia armónica puede proporcionar una ruptura mejorada de las vesículas en comparación con la energía ultrasónica que implica una sola frecuencia. También, se contempla que el intervalo de frecuencias preferido pueda residir dentro de las frecuencias armónicas fundamentales de las vesículas. También se puede usar una energía más baja con este dispositivo. Un dispositivo de ultrasonido que se puede emplear en relación con la segunda terapia de armónicos antes mencionada se describe, por ejemplo, en Kawabata, K. et al., Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 3, páginas 1-5 (1996), cuyas divulgaciones se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

En relación con métodos que implican imágenes ultrasónicas, particularmente en realizaciones que implican vesículas, la formación de imágenes de ultrasonido diagnósticas puede llevarse a cabo simultáneamente con la aplicación de ondas ultrasónicas terapéuticas para romper las vesículas con fines tales como, por ejemplo, la cavitación mejorada o liberación dirigida de un agente bioactivo combinado con las vesículas. El método comprende las etapas de (i) administrar al paciente una cantidad de vesículas; (ii) insonación de las vesículas en una región del paciente con ondas ultrasónicas terapéuticas a una frecuencia y energía para provocar la ruptura de las vesículas; y (iii) recibir simultáneamente emisiones ultrasónicas de las vesículas insonadas a un armónico de la frecuencia de las ondas ultrasónicas terapéuticas y generar una imagen de dicha región a partir de las emisiones ultrasónicas recibidas. La formación simultánea de imágenes permite al operador monitorear la ruptura de las vesículas en tiempo real.

Como reconocerá un experto en la técnica, una vez armados con las enseñanzas de la presente divulgación, pueden emplearse cantidades muy variadas de vesículas en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Como se usa aquí, el término "cantidad de vesículas" pretende abarcar todas estas cantidades.

La formación de imágenes diagnósticas es un medio para visualizar las regiones internas del cuerpo de un paciente. La imagenología diagnóstica incluye, por ejemplo, ultrasonido (US), formación de imágenes de resonancia magnética (IRM), resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía computarizada (CT), resonancia de espín de electrones (ESR); medicina nuclear cuando el medio de contraste incluye material radiactivo; y la formación de imágenes ópticas, particularmente con un medio de contraste fluorescente. La formación de imágenes diagnósticas también incluye la promoción de la ruptura de las vesículas a través de los métodos de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar ultrasonido para visualizar las vesículas y verificar la localización de las vesículas en cierto tejido. Además, se puede usar ultrasonido para promover la ruptura de las vesículas una vez que las vesículas alcancen el objetivo deseado, incluyendo el destino del tejido y/o receptor, liberando así un agente bioactivo y/o un agente de diagnóstico.

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos de formación de imágenes de un paciente en general, y/o en el diagnóstico específico de la presencia de tejido enfermo en un paciente. El procedimiento de obtención de imágenes de la presente invención puede llevarse a cabo mediante la administración de un medio de contraste de la invención a un paciente y luego escanear al paciente usando, por ejemplo, ultrasonido, tomografía computarizada y/o imágenes de resonancia magnética para obtener imágenes visibles de una región interna de un paciente y/o de cualquier tejido enfermo en esa región. Por región de un paciente, se entiende todo el paciente o un área o porción particular del paciente.

Para emplear los agentes de contraste, se suspenden preferiblemente en solución acuosa y el medio de contraste se formula utilizando técnicas estériles. Una ventaja de usar liposomas más pequeños (por ejemplo, de 200 nm y de tamaño menor) y micelas o lípidos emulsionados, así como la simple suspensión de iones paramagnéticos y compuestos liposolubles, es que los agentes de contraste pueden filtrarse a través de filtros en línea de 0,22 micras ya sea inmediatamente antes de la administración, tal como por inyección intravenosa, o como etapa final en la formulación de los agentes de contraste, para eliminar cualquier posible pirógeno.

Para formular estos agentes de contraste en preparaciones estables se pueden emplear otros aditivos. Por ejemplo, en la formulación de agentes de contraste para inyección intravenosa, se pueden incluir aditivos parenterales en la preparación. Dichos aditivos incluyen aditivos de ajuste de la tonicidad tales como dextrosa y cloruro de sodio, para formular un medio de contraste isosmótico. Estos aditivos de tonicidad se proporcionan generalmente en cantidades menores, tales como aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 0,5% en peso de la formulación total. Además, se pueden incluir aditivos antimicrobianos en la preparación final para evitar el crecimiento bacteriano. Tales aditivos antimicrobianos, en cantidades generalmente aceptables, pueden incluir, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio (típicamente 0,01% en peso de la formulación total), alcohol bencilico (típicamente 1-2% en peso), clorobutanol (típicamente 0,25-0,5% en peso), metacresol (típicamente 0,1-0,3% en peso), p-hidroxibenzoato de butilo (típicamente 0,015% en peso), p-hidroxibenzoato de metilo (típicamente 0,1-0,2% en peso), p-hidroxibenzoato de propilo (típicamente 0,2% en peso), fenol (0,25-0,5% en peso) y timerosal (típicamente 0,01% en peso). Adicionalmente, pueden incluirse antioxidantes en la preparación, y son particularmente útiles cuando el agente de contraste contiene lípidos insaturados. Tales antioxidantes en sus cantidades generalmente útiles incluyen ácido ascórbico (típicamente 0,01-0,5% en peso), cisteína (típicamente 0,1-0,5% en peso), monoglicérol (típicamente 0,1-1,0% en peso), bisulfito de sodio (típicamente 0,1-1,0% en peso), metabisulfito de sodio (típicamente 0,1-1,0% en peso) y tocoferoles (típicamente 0,05-0,5% en peso). Como reconocerán los expertos en la técnica, los agentes de contraste de la invención pueden formularse en una diversidad de medios para ser particularmente adecuados para la administración intravascular, administración en cualquier cavidad corporal u otros objetivos de suministro.

Agentes Adicionales

También se contempla que sea parte de la presente invención preparar microsferas utilizando composiciones de materia además de los lípidos y polímeros biocompatibles descritos anteriormente, con la condición de que

las microesferas así preparadas cumplan con los criterios de estabilidad y otros criterios establecidos en la presente memoria.

5 Se puede añadir propilenglicol para eliminar la nubosidad facilitando la dispersión o disolución de las partículas lipídicas. El propilenglicol también puede funcionar como un agente espesante que mejora la formación y estabilización de las microesferas aumentando la tensión superficial en la membrana de las microesferas o la piel. Es posible que el propilenglicol funcione adicionalmente como una capa adicional que recubre la membrana o la piel de la microesfera, proporcionando así una estabilización adicional. Como ejemplos de tales compuestos estabilizantes básicos o auxiliares adicionales, hay tensoactivos convencionales que pueden usarse, por ejemplo, consultar las patentes de Estados Unidos Nos. 4.684.479 y 5.215.680.

10 Compuestos estabilizantes auxiliares y básicos adicionales incluyen agentes tales como aceite de cacahuete, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de maíz, o cualquier otro aceite comúnmente conocido que pueda ser ingerido que sea adecuado para su uso como compuesto estabilizante de acuerdo con la requisitos e instrucciones establecidos en la presente memoria descriptiva.

15 Además, los compuestos utilizados para fabricar sistemas micelares mixtos pueden ser adecuados para su uso como compuestos estabilizantes básicos o auxiliares, y éstos incluyen, pero no se limitan a: bromuro de lauriltrimetilamonio (dodecilo), bromuro de cetiltrimetilamonio (hexadecilo), bromuro de miristiltrimetilamonio (tetradecilo), cloruro de alquildimetilbencilamonio (alquilo = C₁₂, C₁₄, C₁₆), bromuro/cloruro de bencildimetil-dodecilamonio, bromuro/cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro/cloruro de bencildimetil tetradecilamonio, bromuro/cloruro de cetil-dimetiletilamonio o bromuro/cloruro de cetilpiridinio.

20 Se ha encontrado que los liposomas usados en la presente invención pueden ser controlados de acuerdo con su tamaño, solubilidad y estabilidad térmica eligiendo entre los diversos agentes estabilizadores adicionales o auxiliares descritos en la presente memoria. Estos agentes pueden afectar estos parámetros de las microesferas no sólo por su interacción física con los revestimientos lipídicos, sino también por su capacidad para modificar la viscosidad y la tensión superficial de la superficie del liposoma. Por consiguiente, los liposomas utilizados en la presente invención pueden modificarse favorablemente y estabilizarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la adición de uno o más de una amplia variedad de (a) modificadores de la viscosidad, incluyendo, pero sin limitarse a, carbohidratos y sus derivados fosforilados y sulfonados; y poliéteres, preferiblemente con intervalos de pesos moleculares entre 400 y 100.000; di y trihidroxialcanos y sus polímeros, preferiblemente con intervalos de pesos moleculares entre 200 y 50.000; (b) agentes emulsionantes y/o solubilizantes también se pueden usar junto con los lípidos para conseguir las modificaciones deseadas y una estabilización adicional; dichos agentes incluyen, pero sin limitarse a, acacia, colesterol, dietanolamina, monoestearato de glicerilo, alcoholes de lanolina, lecitina, mono y diglicéridos, monoetanolamina, ácido oleico, alcohol oleílico, poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188, poloxámero 184, poloxámero 50), estearato de polioxietileno 50, polioxilo 35 aceite de ricino, polioxilo 10 oleil éter, polioxilo 20 cetoestearil éter, polioxilo 40 estearato, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, propilenglicol diacetato, propilenglicol monoestearato, lauril sulfato de sodio, estearato de sodio, monolaurato de sorbitán, monooleato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sodio, ácido esteárico, trolamina y cera emulsionante; (c) los agentes de suspensión y/o aumento de la viscosidad que se pueden usar con los lípidos incluyen, pero sin limitarse a, acacia, agar, ácido algínico, monoestearato de aluminio, bentonita, magma, carbómero 934P, carboximetilcelulosa, calcio y sodio 12, carragenano, celulosa, dextrano, gelatina, goma de guar, goma de algarrobo, veegum, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, silicato de magnesio-aluminio, metilcelulosa, pectina, óxido de polietileno, povidona, alginato de propilenglicol, dióxido de silicio, alginato de sodio, tragacanto, goma de xantano, alfa-D-gluconolactona, glicerol y manitol; (d) también se pueden utilizar agentes de suspensión sintéticos tales como polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), polipropilenglicol y polisorbato; y (e) se pueden incluir agentes de aumento de tonicidad; tales agentes incluyen pero no se limitan a sorbitol, propilenglicol y glicerol.

45 Los diluyentes que se pueden emplear para crear un ambiente acuoso incluyen, pero no se limitan a agua, desionizada o que contenga cualquier número de sales disueltas, etc., que no interfieran con la creación y el mantenimiento de las microesferas estabilizadas o su utilización como agentes de contraste de IRM; y solución salina normal y solución salina fisiológica.

Ejemplos experimentales

60 Ejemplo 1: Preparación y suministro de saposina C y de liposomas *in vitro* e *in vivo*

65 Materiales: Los materiales siguientes son de fuentes comerciales: laminina de ratón, P/S, suero bovino fetal y DMEM (Gibco BRL, Gaithersburg, MD); medio neurobasal con suplemento de B27 (Life Technologies.); endonucleasas de restricción (New England Biolabs, Beverly, MA); vector de ADN pET21a(+), cepa huésped de *E. Coli* [BL21 (DE3)], y la resina His•Bind (Novagen, Madison, WI); anticuerpo monoclonal anti-His conjugado con Alexa Fluor488 (QIAGEN, Valencia, CA); anticuerpos anticonejo de cabra conjugados con fluoresceína y antirratón de oveja conjugados con rodamina (ICN/CAPPEL, Aurora, OH); reactivo contra la decoloración

(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ); columna de HPLC de fase inversa C₄ (Alltech Association Inc., Deerfield, IL); DOPS y 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfo-L-Serina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (NBD-DOPS) como soluciones madre en cloroformo (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL); polietilenimina y papaína (Sigma, St. Louis, MO). Los lípidos aniónicos son sales de sodio. Todos los demás productos químicos son de grado reactivo o mejor.

Cultivos celulares de fibroblastos: Se usan fibroblastos primarios humanos y de ratón para todos los experimentos y se establecen con procedimientos estándar en este laboratorio.¹⁵ Fibroblastos deficientes en prosaposina de ratón de ratones PSAP^{-/-}. Todas las células se cultivan en medio DMEM/FBS (10%) a 37°C en monocapa para el siguiente uso.

Cultivo de neuronas corticales primarias: Las neuronas corticales se cultivan en medio Neurobasal libre de suero con suplementos de B27 tal como se describe por Whitmarsh et al.⁴⁴ Extraer los embriones de ratón E16, cortar la cabeza y colocarlos en solución salina equilibrada de Hank libre de Ca/Mg enhiada con hielo (HBSS) con papaína (1 mg/mL). El cerebro se disecciona y coloca el bisturí a lo largo de la línea media dorsal entre los dos hemisferios cerebrales, pero se desvía ligeramente hacia el lado a medida que se hace el corte. Esto producirá una corteza cerebral limpia. Se retiran las meninges suavemente sin tocar el lado medial de la corteza donde se encuentra el hipocampo. Se separa la corteza con tijeras quirúrgicas finas curvas y se recoge en HBSS enhiado con hielo. El tejido cortical se reemplaza en solución de HBSS con papaína durante 15-20 minutos a temperatura ambiente para ablandar los tejidos. Se transfieren a una solución de inhibidor de papaína durante otros 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se devuelven a 2 mL de HBSS enhiado con hielo. Se recubren los cubreobjetos de Fisherbrant 12-546 (18CIR-2) en una placa de 12 pozos con laminina que contiene PEI durante la noche. Los tejidos corticales aislados se cultivan en el cubreobjetos recubierto con PEI en la placa con medio Neurobasal/B27. El tratamiento con kainato se realiza mediante la adición del fármaco al medio.

Preparación de saposina C y de los liposomas

La saposina C recombinante se produce rutinariamente usando el sistema pET inductor de IPTG en células de *E. coli*.¹¹ Todas las proteínas expresadas contenían una etiqueta His, y se purificaron en una columna de níquel y con cromatografía de HPLC de fase inversa C₄ usando un gradiente lineal (0-100%) de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1%. El pico más grande de proteína se recoge y se liofiliza. Las concentraciones de proteína se determinan como se ha descrito previamente por Qi et al.¹¹

Los lípidos de DOPS (16,2 µg) en cloroformo se secan bajo atmósfera de N₂ y vacío para formar una película de lípidos. Se añade saposina C (79 µg) a la película lipídica y se suspende en 50 µl de ácido cítrico 0,1 M/fosfato 0,2 M (pH 4,7). Se añade medio adicional o PBS. Se preparan vesículas unilamelares grandes (LUV) por sonicación en baño.¹⁴ El tamaño de los liposomas se mide por espectroscopia de correlación de fotones con un analizador de tamaño de partícula inferior a una micra N4+ (Coulter, Miami, FL). Los tamaños de las poblaciones de LUV se evalúan utilizando el analizador de tamaño de partícula inferior a una micra N4+ y se dispersan con un diámetro medio de 250 ± 100 nm.

Suministro de proteoliposomas de saposina C-DOPS *in vitro* e *in vivo*

Las células (10⁵) se cultivan en medio DMEM durante 48 h en un portaobjetos de cámara de 8 pozos con cubreobjetos (Lab-Tek II, Nalge Nunc International). Se añade complejo de saposina C-DOPS en el medio dentro de los cultivos celulares. Después de incubarse a 37°C durante 48 h, las células se lavan con PBS dos veces, y se fijan con paraformaldehído al 2% para el ensayo de inmunofluorescencia. Para un estudio *in vivo*, se inyectan los proteoliposomas en PBS en ratones a través de las venas de la cola. Los tejidos cerebrales de ratón se recogen a las 48 horas después de la administración del complejo de proteína-lípido para el ensayo de inmunofluorescencia.

Histopatología e inmunofluorescencia

Los tejidos cerebrales de los ratones se fijan y se congelan instantáneamente en formalina al 10% antes de ser procesados. Las secciones de parafina se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E), y se analizan bajo microscopía óptica.

La tinción con inmunofluorescencia se hizo como se describe con modificaciones menores.¹⁵ Las células cultivadas (1 x 10⁵) en una placa con cubreobjetos se lavan con PBS y se fijan con paraformaldehído al 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Después de tratar con Triton X-100 al 0,1% en PBS, las muestras se incuban con cada antisuero primario respectivo (durante 2 h) y anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia (durante 1 h) a 37°C. Las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios son 1:30 y 1:60, respectivamente. Las secciones de tejido cerebral de ratón en paraformaldehído al 4% se incuban con una solución en bloque que contiene 5% de suero de ratón antes de la adición del anticuerpo anti-His primario. El anticuerpo anti-ratón conjugado con rodamina se utiliza como anticuerpo secundario para la detección. Se añade reactivo antidesvanecimiento en la sección para evitar la detención de fluorescencia. Las señales de

fluorescencia se detectan mediante microscopía confocal (LSM510, Zeiss) o microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioskop).

5 Ejemplo 2: Síntesis de liposomas usando lípidos ácidos de cadena larga, lípidos neutros de cadena larga y lípidos neutros de cadena corta

Materiales y métodos

10 Todos los fosfolípidos DOPS, DPPC y DHPC se adquieren en forma de polvo a partir de lípidos polares de Avanti y se usan sin purificación adicional. Para las mediciones dinámicas de dispersión de luz (DLS), la relación molar de DOPS a DPPC en las mezclas oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 1 con $([DPPC] + [DOPS])/DHPC =$ aproximadamente 4 para todas las muestras. Las mezclas de lípidos se disuelven en H₂O ultrapura filtrada (Millipore EASYpure UV) con una concentración total de lípidos de 10% en peso utilizando una combinación de vórtex y ciclo de temperatura, entre 50 y 4°C. Las disoluciones homogeneizadas al 10% en peso se diluyen progresivamente en 5, 2, 1, 0,5 y 0,1% en peso con H₂O filtrada.

20 Antes de DLS, las muestras madre de lípidos se diluyen 5, 50 y 200 veces y se analizan usando un clasificador de tamaño de partículas N4⁺ (Coulter, Miami, FL). Se determina que la dilución del sistema no tuvo ningún efecto sobre la determinación del tamaño. En el caso de experimentos con SANS, se aplica el mismo protocolo de preparación de muestra a la muestra $[DOPS]/[DPPC] = 10$, excepto que se usa D₂O (99,9%, Chalk River Laboratories, Chalk River, ON) en lugar de H₂O para obtener una muestra que tiene una concentración total de lípidos del 0,5% en peso. La disolución al 0,5% en peso se diluye adicionalmente en mezclas al 0,1 y 0,05% en peso usando un regulador ácido compuesto de volúmenes iguales de acetato de sodio 0,1 N (NaAc) y ácido acético 0,1N (HAc). La solución resultante tenía un valor de pH de $4,78 \pm 0,02$ en D₂O, y el pH del regulador es estable más de 12 veces con D₂O.

30 En el caso de experimentos con SANS, se aplica el mismo procedimiento de preparación de muestra a la muestra $[DOPS]/[DPPC] = 10$, excepto que se usa D₂O (99,9%, Chalk River Lab.) en reemplazo de H₂O filtrada hasta que la concentración total de lípidos es del 0,5% en peso. Después, se diluye la solución al 0,5% en peso en 0,1 y 0,05% en peso con un regulador ácido compuesto de una mezcla de volumen igual de acetato de sodio 0,1 N (NaAc) y solución de ácido acético 0,1N (HAc) obteniéndose un valor de pH de $(4,78 \pm 0,02)$ en D₂O. El valor de pH del regulador es estable más de 12 veces de dilución con D₂O.

35 SapC se sobreexpresa en células de *E. coli* mediante la utilización del sistema pET inductor de IPTG (26). Las proteínas expresadas con una etiqueta His se eluyen a partir de columnas de níquel. Después de la diálisis, las proteínas se purifican adicionalmente mediante cromatografía de HPLC de la siguiente manera: La columna de fase inversa C4 se equilibra con ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) durante 10 minutos y después se eluyen las proteínas en un gradiente lineal (0-100%) de TFA al 0,1% en acetonitrilo durante 60 minutos. El mayor pico de proteína se recoge y se liofiliza. Las concentraciones de proteína se determinan como se ha descrito previamente. Qi et al., 1994.

45 Los péptidos H1 (YCEVCEFLVKEVTKLID) y H2 (EKEILDADFDMCKSLPK) son sintetizados por SynPep Corp. (California, EE.UU.) y disueltos en D₂O a una concentración de 1,5 mg/mL. La solución de lípido al 0,1% en peso con $[DOPS]/[DPPC] = 10$ y $([DPPC] + [DOPS])/DHPC = 4$ se agrega individualmente con las dos soluciones de péptido (1,5 mg/mL) con una relación en volumen de aproximadamente 12:1 y la solución de SapC con una relación en volumen de aproximadamente 12:1 para producir la concentración final de péptido (o SapC) de 62,5 μM, que es mayor que la concentración de SapC necesaria para inducir la desestabilización de la membrana. (Wang, et al., 2003).

50 El experimento SANS se lleva a cabo en uno de los instrumentos SANS 30m, NG7, localizado en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) Center for Neutron Research (NCNR, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se utilizan una longitud de onda λ de 8,09 Å y una lente de enfoque de neutrones en combinación de una distancia de muestra a detector larga (SDD) de 15,3 m para obtener valores más pequeños del vector de dispersión, $q = 4\pi/\lambda \cdot \text{seno}(\theta/2)$, donde θ es el ángulo de dispersión. Los otros dos SDD de 5 y 1 m también se emplean para cubrir un intervalo completo de q de 0,002 a 0,35 Å⁻¹. Los datos en bruto bidimensionales se corrigen a continuación por la sensibilidad del detector, el fondo, la dispersión de celdas vacías y la transmisión de la muestra, y luego se hacen promedios circulares alrededor del centro del haz para producir datos unidimensionales. Los datos unidimensionales se ponen en la escala absoluta de acuerdo con el flujo del haz directo. La meseta incoherente se determina promediando la intensidad de los últimos 10 ~ 20 puntos de datos y se resta de los datos reducidos.

65 El tamaño de los liposomas se mide por espectroscopía de correlación de fotones con un analizador de tamaño de partícula inferior a una micra N4⁺ (Coulter, Miami, FL) como se describe (14, 15). Los tamaños de las poblaciones de LUV se evalúan utilizando el analizador de tamaño de partículas inferior a una micra N4⁺ y se polidispersan con un diámetro medio entre 20-800 nm. Los datos para la estimación del tamaño de los liposomas se obtienen a un ángulo de 90° y se procesan utilizando el análisis del proceso de distribución por tamaños

(SDP) con una función de autocorrelación equitativa. El tamaño se presenta con una fracción importante de vesículas por determinación de SDP. La significación estadística se estima con el análisis de ANOVA. Las barras de error indican la desviación estándar.

5 Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se toman con un TEM Hitachi (H-7600, HITACHI, Japón). Se coloca una gotita de cada muestra sobre una rejilla de níquel recubierta con una película Formvar de soporte (malla 200, un intervalo de espesor de 30 a 75 nm, Electron Microscopy Sciences, PA). La rejilla se
10 coloca sobre el papel de filtro a temperatura ambiente durante 2 h antes del análisis de TEM. La TEM funciona con una tensión de aceleración de 80 kV. El fondo de formación de imágenes se optimiza con gran aumento, mientras que el área de interés se localiza con un aumento bajo (50-1.000 X). Se enfoca una sola vesícula usando un aumento de hasta 50.000 X. El contraste y el brillo se ajustan manualmente hasta que se obtiene una imagen "nítida" y el fondo de la imagen se optimiza con un aumento alto. Las micrografías de TEM se toman
15 utilizando una cámara digital dual CCD AMT (2K x 2K, 16 bits) con el software apropiado de adquisición de imágenes.

Con respecto a la realización que utiliza lípidos de cadena corta, el modelo generalmente aceptado para la cinética de formación de ULV de baja polidispersidad se describe como sigue:

20 Inicialmente, el precursor micelar discoidal comienza a formarse con el recubrimiento lipídico de cadena corta en el borde y los lípidos de cadena larga en la superficie plana bicapa de los discos para minimizar la energía de curvatura en el borde. Tanto la dilución como la elevación de la temperatura causan la pérdida del lípido de cadena corta en el borde de la bicapa o solución, dando como resultado un aumento de la tensión de la línea y consecuentemente la coalescencia entre los discos para formar discos más grandes. A medida que el aumento de la tensión de la línea sobrepasa la coalescencia de las micelas discoidales cercanas, la longitud del contorno
25 del borde tiene que disminuir, haciendo que la bicapa se pliegue en una concha esférica con una abertura cuyos bordes están cubiertos por el lípido de cadena corta. Eventualmente, la apertura puede cerrarse con la desaparición del lípido corto alrededor del borde, dando como resultado la morfología de las vesículas.

Ejemplo 3: Detección por RM de células tumorales marcadas con USPIO usando liposomas DOPS

30 Para preparar los liposomas que contienen marcadores detectables por RM tales como USPIO, se utiliza el siguiente método. La sonicación de partículas de USPIO recubiertas con dextrano en solución acuosa con DOPS no produce suficiente encapsulación en los liposomas. Con el fin de aumentar el contenido de USPIO en los liposomas, se utiliza con modificaciones menores un método de acoplamiento químico como el descrito por Bogdanov et al., Trapping of dextran-coated colloids in liposomes by transient binding to aminophospholipid:
35 preparation of ferrosomes. Biochim Biophys Acta, 1994. 1193(1): páginas 212-8. Brevemente, el recubrimiento con dextrano sobre las partículas de USPIO se oxida para generar grupos aldehído. Los aldehídos forman un enlace de Schiff covalente a pH alto con aminos de DOPS. Los liposomas obtenidos tienen un tamaño medio de 150 nm como se ha confirmado mediante el análisis con el clasificador de tamaño de partícula N4+ (Beckman Coulter, CA). La solución de liposomas se dializa contra una solución de bajo pH para separar la USPIO unida a la capa externa de los liposomas. La USPIO no encapsulada se elimina por cromatografía de afinidad usando una columna Con-A Sefarosa 4B (Amersham Biosciences Corp., NJ). La estructura liposómica USPIO-DOPS se confirma mediante microscopía electrónica convencional. Para estimar la concentración de hierro en los liposomas de DOPS se utiliza una curva de relajación R2 estándar generada usando las cantidades conocidas
40 de mezclas de liposomas USPIO y DOPS libres. Se logra un contenido máximo de 32 µg Fe/mL usando una concentración de DOPS de 1 mM. Se preparan cuatro muestras de células de neuroblastoma con aproximadamente 10.000 células por grupo. La primera y segunda muestras se incuban con una preparación de liposomas USPIO-DOPS 100 µM y 300 µM en medio de crecimiento, respectivamente. La tercera muestra contenía células sin USPIO o liposomas. Después de la incubación durante 36 horas, las células se lavan 4 veces, se tripsinizan y se fijan en una mezcla de solución de agarosa al 0,5% y medio de cultivo (1:1) en viales de vidrio de 4 mL.
50

La obtención de imágenes por RM de alta resolución de las células se realiza usando un escáner 7T Bruker Biospec usando métodos de eco de gradiente optimizados para la ponderación T2. Se utiliza una secuencia de formación de imágenes tridimensionales FLASH con TR/TE/0 de 200 ms/35 ms/10° y una matriz de 320 X 320 X 64 para un FOV de 3,2 cm x 3,2 cm x 0,64 cm resultando en una resolución isotrópica de 100 µm.
55

Las imágenes de RM indican la captación de partículas de USPIO por células en las muestras 1 y 2, mostrando la muestra 2 una mayor captación correspondiente a la mayor concentración de liposomas USPIO-DOPS. Se detecta un número mucho menor de células en muestras que contienen células con solución de liposoma-USPIO preparada por sonicación. Se obtiene una estimación del número de células detectadas en cada vial utilizando un algoritmo de posterior al procesamiento escrito en IDL. El número de células detectadas en el vial 2 es aproximadamente 1,4 veces comparado con el vial 1. La relación media de contraste a ruido (CNR) entre el gel y las regiones de baja intensidad que representan las células es 20,15, SD 11.
60
65

Ejemplo 4: Preparación de proteoliposomas de SapC-DOPS

La protonación de SapC se usa para promover la unión de membranas de SapC y DOPS. Primero, se protona SapC disolviendo en un regulador ácido de alícuotas (pH 5, 20 μ l), luego se diluye con PBS o regulador neutro (pH 7) en 1 mL de volumen final. Alternativamente, se puede usar ácido de Brønsted (tal como TFE, cloroformo, metonal, etc.) para disolver SapC con lípidos DOPS. Se ha descrito que estos ácidos de Brønsted son un buen donante de enlaces H y que tienen un efecto de protonación sobre las proteínas (1). Estos disolventes se pueden evaporar hasta sequedad bajo atmósfera de gas N₂ o un sistema de vacío. Se añade regulador adecuado (tal como PBS) para formar proteoliposomas SapC-DOPS. Este procedimiento es para evitar la fusión de liposomas DOPS inducida por SapC a pH ácido. Los proteoliposomas preparados por este enfoque están en una forma monodispersa con un tamaño medio a 200 nm.

Ejemplo 5: Fuga con control de temperatura de proteoliposomas SapC-DOPS

Los proteoliposomas SapC-DOPS están diseñados con diversas composiciones lipídicas para ser sensibles a la temperatura para la fuga de los contenidos encapsulados en los liposomas.

Ejemplo 6: Caracterización de liposomas/saposina C

Para elucidar la interacción temporal y espacial de saposinas con membranas liposómicas, el inventor se ha enfocado en el desarrollo de métodos de determinación de fluorescencia intrínseca (Trp) y/o extrínseca (NBD, pireno, etc.). Estos enfoques incluyen el cambio máximo del espectro de emisión, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, el análisis de flujo de detención de la fluorescencia, el análisis de flujo de los complejos de perlas fluorescentes-saposina-liposoma y la microscopía de fluorescencia. Además, se usa dicroísmo circular (DC) para evaluar los cambios de la estructura secundaria relativa de saposinas libres de lípidos con respecto a las unidas a lípidos. Los análisis de los resultados iniciales evolucionaron hacia la hipótesis propuesta.

A continuación, se resumen los estudios relacionados con la expresión, purificación, análisis funcional, mutagénesis, así como análisis de fluorescencia de la interacción saposina-fosfolípido y fusión de membrana.

I. Purificación y caracterización de saposinas naturales y recombinantes

a) Expresión de saposinas de sistemas procariotas

Aunque las saposinas naturales han sido aisladas y caracterizadas, es importante establecer un sistema de expresión recombinante para proporcionar una fuente accesible de grandes cantidades de saposinas normales, mutadas y marcadas con Trp para las investigaciones propuestas. Se desarrolla un sistema procariota basado en lo siguiente: 1) Las saposinas tienen al menos un sitio de N-glicosilación ocupado, pero, para las saposinas B y C, la ocupación de estos sitios no es necesaria para la función. 2) La expresión de proteínas en sistemas eucariotas es intensiva en mano de obra y recursos, y lenta. En comparación, los sistemas procariotas son rápidos y proporcionan altos rendimientos de proteínas de tipo silvestre y mutantes. Y 3) Las proteínas pueden ser marcadas con residuos de Trp como sondas de fluorescencia intrínseca, ya que el tipo silvestre A es la única saposina que contiene un Trp natural (37W).

b) Producción de saposinas activas en *E. Coli*

Las saposinas funcionales se sobreexpresaron en células BL21 (DE3) usando un vector de la serie pET 21a. Después de la inducción de IPTG a 37°C o 30°C, se encontraron grandes cantidades de saposinas que contenían etiqueta His en la fracción soluble de las células rotas. Éstas se purificaron convenientemente hasta homogeneidad electroforética en columnas cargadas con níquel. Alternativamente, se generaron saposinas sin etiqueta His introduciendo un codón de parada después de la región codificadora de proteína, y luego se purificaron usando columnas de inmunoafinidad con anticuerpo monoclonal T7-taq. La saposina C recombinante purificada muestra una excelente activación de la beta-glucosidasa ácida y otras propiedades biológicas. Se utilizaron espectros de dicroísmo circular, dispersión de luz y análisis ES-MS para evaluar las propiedades físicas de las saposinas purificadas, tales como el estado de agregación y el peso molecular. También se generaron Trp-saposinas sin etiqueta His para los experimentos de control necesarios. La integridad funcional de la saposina C recombinante se determina usando la β -glucosidasa ácida deslipidada y homogénea en un sistema de reconstitución liposomal y en ensayos neuritogénicos. La función de la saposina B recombinante se determina usando un ensayo de unión a sulfatida. La función *in vitro* de las saposinas recombinantes B y C son similares a las saposinas naturales o desglicosiladas.

II. Conformaciones funcionales de las saposinas inducidas por los fosfolípidos

Para determinar la especificidad de la interacción de saposina C-fosfolípido, se desarrolla un sistema liposómico usando DC, cambios de emisión de fluorescencia y métodos de detención de fluorescencia. Las saposinas C

mutadas, producidas para contener Trp (W) individual, se denominan saposina C (0W), (S37W) y (81W). Estas saposinas C marcadas con Trp son las siguientes: la saposina C (0W) tiene un Trp precedente al primer aminoácido del extremo terminal NH₂ de saposina C madura, la saposina C (S37W) tiene un Trp en el residuo 37 (es decir, en el medio), y la saposina C (81W) tiene un Trp después del último aminoácido del extremo terminal COOH. Estas sustituciones no tuvieron ningún efecto sobre las propiedades de activación o espectros de DC de la saposina C.

a) Espectros de DC

Utilizando espectroscopia de DC, se indujeron cambios estructurales secundarios relativos de saposinas recombinantes mediante unión a membrana. Los cambios estructurales secundarios relativos de saposinas obtenidas a partir de los complejos de fosfatidilserina (PS)/saposina C ácidos e insaturados y de los complejos de fosfatidilcolina (PC)/saposina B neutros son similares y dan como resultado una disminución del contenido de cadena β y un aumento del contenido de hélice α (Tabla 4).

Tabla 4

Dicroísmo Circular (195-250 nm) Análisis de Saposinas con diversos fosfolípidos				
II. Saposina	% de α	% de β	% de T	% de R
C solamente	29,9	41,7	0,0	28,4
C + Fosfatidilserina (18:0,0)	30,1	40,4	1,4	28,1
C + Fosfatidilcolina (18:1,1)	30,6	41,0	0,0	28,4
C + Fosfatidilserina (18:1,1)	49,8	3,9	14,0	32,4
B solamente	43,7	36,6	0,0	19,7
B + Fosfatidilserina (18:1,1)	43,8	38,8	0,0	17,9
B + Fosfatidilcolina (18:1,1)	68,2	24,2	5,3	2,3
A solamente	44,0	31,9	0,0	24,1
A + Fosfatidilserina (18:1,1)	39,3	34,9	0,5	25,4

No se observan cambios con la saposina A y B en los complejos PS (18:1,1). Estos resultados indican que la saposina A y B tienen una interacción de membrana diferente a la de las saposinas C. Los datos de DC se recogen en un instrumento Jasco 710 y se desconvolucionan usando el método de Yang (véase Chang, CT, Wu, CS y Yang, JT Anal Biochem (1978) 91, 13-31).

b) Espectros de emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión de proteínas cambian cuando los entornos de triptofanilo cambian de polaridad. Los espectros de fluorescencia de las saposinas A (0W), A (37W), A (81W), C (0W) y C (81W) obtenidos tras la adición de liposomas de fosfatidilserina cerebral (BPS), mostraron desplazamientos al azul (Tabla 5).

Tabla 5

Emisión máxima de fluorescencia de saposinas con Trp en ausencia y presencia de fosfatidilserina de cerebro (BPS)			
Saposinas	Emisión máxima (ME, nm)		Desplazamientos de ME
	-BPS	+BPS	
C(0W)			
C(S37W)	339	333	Azul
C(S37W, Q48N)	351	351	No
C(S37W, Q48A/E49A)	345	339	Azul
C(81 W)	338	329	Azul
A(0W)	339	323	Azul
A(37W)	345	333	Azul
A(37W)	351	338	Azul
A(37W, G64E)	344	358	Rojo
A(37W, G64E/M65V)	339	350	Rojo
A(81W)	345	336	Azul

Condiciones experimentales: pH 4,7, proteína: lípido = 1:20 a 40. No se observan diferencias a 22 o 37°C.

Los desplazamientos hacia el azul sugieren la interacción de saposinas con lípidos durante la formación del complejo. Sin embargo, la saposina C (S37W) no muestra desplazamiento en presencia de BPS. Esto implica

que los extremos terminales NH₂-(0W) y COOH-(81 W) de la saposina C entran en la membrana mientras que el medio de la secuencia no. Con saposina A, ocurre lo contrario con el medio de la secuencia (37W) en la membrana. Esto significa que las asociaciones de la membrana con saposina A son muy diferentes de las de la saposina C. Estos resultados son consistentes con el análisis de DC. No se observan cambios de longitud de onda de emisión máxima con saposinas A o C en presencia de EPC neutra ni con PS que contengan cadenas de ácidos grasos saturados.

1. Interacción temporal y espacial de saposinas y membranas de fosfolípidos

Para investigar las interacciones temporales y espaciales de las saposinas y la membrana liposómica, se usan enfoques de flujo detenido de fluorescencia y de detención con Trp como sonda de fluorescencia intrínseca de las saposinas. Estos experimentos permiten identificar las interacciones regionales entre las saposinas y las bicapas lipídicas, así como la cinética de su unión.

Interacciones temporales

La intensidad de fluorescencia aumentó significativamente tras la unión de saposina C(0W) a vesículas de fosfatidilserina sintética [PS (18:1,1)] a pH ácido. Esta unión induce un cambio dependiente de la concentración de lípidos y requiere al menos una cadena de ácido graso insaturado. Para evaluar la cinética de esta interacción, se realizan experimentos de flujo detenido, se monitorea el cambio en la fluorescencia durante la formación de complejo de saposina C/liposoma. Cuando la saposina C(0W) se mezcla con vesículas de PS (18:1,1) o BPS, la fluorescencia de Trp se incrementa, pero el curso del tiempo de este cambio es indetectable debido a la limitación de la capacidad de la máquina. Aparentemente, la interacción de la saposina C y las membranas que contienen PS insaturada se produce dentro de al menos 10 ms.

A partir de datos de espectros de DC y de emisión, la saposina C se une a fosfolípidos insaturados cargados negativamente. Esto sugiere que hay una interacción electrostática entre residuos cargados positivamente en saposina C y la superficie de la membrana cargada negativamente. Esta interacción inicial es seguida por la incorporación de proteínas en la membrana a través de una interacción hidrófoba. No se observa ningún desplazamiento en la emisión o cambio en la intensidad de la fluorescencia de Trp con la mezcla de saposina C (0W) y PS(18:0,0).

Interacciones espaciales

Para determinar la profundidad de la inserción de saposina en liposomas de BPS, se incorporan fosfatidilcolinas marcadas por espín (SLPC) en liposomas de BPS con porcentajes crecientes en moles (0-50%). Las SLPC, detenedores de fluorescencia hidrófobas, contienen grupos doxilo que están localizados en diferentes carbonos (n) en la cadena acilo: SLPC5 (n = 5), SLPC10 (n = 10) y SLPC16 (n = 16). Después de la adición de saposinas con Trp, se incubaba la mezcla de proteína-liposoma (proteína: lípido = 1: 20) a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego, se registran los cambios de intensidad de fluorescencia. Para las saposinas con Trp que muestran los desplazamientos hacia el azul en la Tabla 2, se observan efectos significativos de detención (30-60%) con los liposomas BPS/SLPC5. La eficiencia de detención depende de la posición en la cadena acilo de los grupos doxilo en SLPC. Cuanto más profundo está el grupo doxilo en la membrana, menor la eficiencia de detención. Con BPS/SLPC10, la fluorescencia de triptofanilo de saposina C (0W) se detiene en un 30%.

2. Fusión de membrana inducida por Saposina C

La saposina C es una molécula multifuncional que tiene actividad enzimática lisosómica y actividades neuritogénicas. La organización detallada función/estructura de la saposina C se muestra en la Figura 3.

Los residuos de aminoácidos 51-67 son necesarios, pero no suficientes, para su función de activación enzimática óptima. La estructura disulfuro y la alteración conformacional de saposina C en la unión de lípidos también son necesarios para esta actividad. Tres enfoques se utilizan para este estudio: (1) flujo detenido que monitorea la reducción de la autodetención resultante de la fusión de vesículas que contienen sonda de fluorescencia con vesículas no fluorescentes inducidas por saposina C; (2) monitoreo de los cambios de tamaño de las vesículas lipídicas tras la adición de saposina C a las vesículas, la distribución del tamaño se determinó utilizando un clasificador de tamaño de partículas con tamaño inferior a una micra N4+ (Coulter Co.); (3) monitorear la fluorescencia intrínseca del cambio de saposina C con Trp durante la fusión liposomal. Estos resultados definen las regiones de actividad fusogénica en el dominio de hélice α en los extremos terminales amino y carboxilo en saposina C y la cinética de fusión liposomal inducida por saposina C (véase a continuación).

Fusión liposomal inducida por saposina C

Las sondas de fluorescencia han sido ampliamente utilizadas para determinar la fusión de membranas, tales como la desactivación de fluorescencia, y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FET), y pueden usarse para análisis cuantitativos y cinéticos. El enfoque de activación se utiliza para investigar la

actividad fusogénica de la saposina C. La octadecil rodamina B (R18) se selecciona como sonda de fluorescencia y es atrapada en el compartimiento acuoso interno de las vesículas liposomales mediante sonicación conjunta con BPS o PS (18: 1,1). R18 muestra una autodetención a concentraciones altas.

- 5 El aumento de la fluorescencia (activación) de R18 ocurre cuando disminuye la concentración de R18. Después de fusionar las vesículas no marcadas y marcadas, la concentración de R18 se diluye, dando como resultado un aumento en la intensidad de la fluorescencia. Las vesículas marcadas con R18 (lípidos:R18 = 96:4, mol:mol) se mezclan con las mismas vesículas lipídicas sin sonda de fluorescencia. Se realizan ensayos de flujo detenido para mezclar rápidamente estas vesículas con saposina C o iones Ca^{2+} . Se generan curvas de seguimiento de tiempo para el análisis cinético. La inducción de la fusión de membrana de PS(18:1,1) insaturada por saposina C muestra la misma cinética que aquellas con Ca^{2+} . La fusión se produce ampliamente cuando la temperatura de reacción está por encima de la temperatura de transición de fase (T_c) de fosfolípidos. La T_c de PS(18:1) sintético es de aproximadamente -11°C , mientras que la T_c de PS(18:0) es muy alta (68°C). Por lo tanto, la fase de bicapa lipídica de PS(18:1,1) es diferente a la de BPS(18:0 y 18:1) a 24°C . Los resultados indican que la cinética de la fusión de membrana inducida por la saposina C se determina por el estado físico de los lípidos de la bicapa.

3. Determinación del cambio de tamaño

- 20 La microscopía electrónica (ME) se utiliza para el análisis de fusión vesicular, ya que el tamaño de las vesículas fusionadas es mayor que las de las no fusionadas. El tamaño de partícula inferior a una micra N_4^+ se utiliza para estimar tamaños de partícula en el intervalo de 3 nm a 3 μm ya que la mayoría de los liposomas encajan en este intervalo. Las condiciones de sonicación con un sonicador de copa producen liposomas de BPS monodispersos con un tamaño de ~ 200 nm. Tras la adición de saposina C, estas vesículas cambian a un tamaño mayor de hasta 2-3 μm . El aumento de tamaño está relacionado con la fusión de vesículas como se muestra por los anteriores experimentos de activación. La saposina C aumenta el tamaño de la vesícula a pH 4,7, pero no a pH 7,4 durante un período de 10 minutos (véase la Figura 4).

- 30 Estos datos sugieren una actividad fusogénica sensible al pH de saposina C. La saposina C promueve los cambios de tamaño a una concentración de ~ 50 nM. Para definir las regiones responsables de esta propiedad de fusión, se ensayan péptidos que contienen sólo el 50% del extremo terminal NH_2 o el 50% de las mitades del extremo terminal COOH en la saposina C. Ambos péptidos muestran actividad de fusión. Estos datos sugieren una fusión mediada por secuencia o secuencias lineales situadas en ambos extremos de la saposina C.

4. Mecanismo de fusión

- 35 Se cree que los cambios conformacionales de proteínas juegan un papel en la fusión de membranas mediada por proteínas. Este mecanismo de fusión se evalúa utilizando la fusión de membrana dependiente de saposina C. En primer lugar, se forman complejos de saposina C-liposoma PS(18: 1,1). En esta membrana anclada con saposina C, se altera la conformación de las proteínas. Este complejo es estable desde un pH de 3 a 10, y en bajas concentraciones de solución de SDS. Esto indicó que la velocidad de disociación de la saposina C de las vesículas PS es muy lenta.

- 45 Dado que el Trp en saposina C(OW) está incrustado dentro de la bicapa lipídica, el cambio de su señal es indicativo de que el entorno circundante de Trp ha sido cambiado. Después de aproximadamente 20 a 30 ms, la señal de fluorescencia de Trp disminuye hasta el nivel inicial. Esto indica que la saposina C en los complejos interactuó con vesículas de PS adicionales. Poco después de esto, la señal cae nuevamente hasta la señal del nivel de inicio al final del proceso de fusión. Estos datos indican que la saposina C retiene la actividad fusogénica incluso cuando se une a la membrana lipídica. Por lo tanto, no es necesario un cambio conformacional de saposina C tras la unión de lípidos para su actividad fusogénica. Este resultado es consistente con la conclusión de que una o más secuencias lineales son suficientes para inducir la fusión de membrana

XI. Optimización y síntesis del gen de la saposina C

- 55 La secuencia de ADN de la saposina C es de codón optimizado para expresión en *E. coli*, teniendo en cuenta la estructura secundaria del ARNm y la eliminación de los sitios de restricción que posteriormente se utilizarán para la subclonación. Los sitios de restricción *NdeI* y *SalI* se añaden en los extremos 5' y 3', respectivamente, del gen, y se añaden codones de doble parada al final de la secuencia codificante de Saposina C para asegurar la terminación apropiada de la proteína expresada. La síntesis de genes se contrata con DNA2.0, y el gen optimizado se confirma mediante secuenciación y se suministra a VTI en el vector de clonación "pJ2". Este constructo vectorial se denomina como *pJ2-SapCg*, el casete optimizado del gen de saposina C, rodeado por los sitios de restricción *NdeI* y *SalI*, se denomina como *SapCg*.

Clonación en *pET24a*

- 65 La clonación de *SapCg* en *pET24a* se lleva a cabo de la siguiente manera. se corta *SapCg* de *pJ2-SapCg* usando los sitios de restricción *NdeI* y *SalI* y se liga en el vector de expresión *pET24a* (Novagen), que también se

ha cortado en esos mismos sitios. Este constructo ligado se transforma en la cepa de clonación de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). La selección se realiza con kanamicina (50 mg/L). La PCR de colonias se lleva a cabo para determinar qué colonias transformadas transportaron el vector con el inserto de *SapCg*. Se elige una colonia para un trabajo posterior a partir de aquellas que dieron positivo. Se prepara ADN de plásmido mediante el kit miniprep de plásmido (Qiagen) a partir de este clon, y la presencia del inserto *SapCg* en el ADN se confirma mediante análisis de restricción y secuencia. Este constructo de plásmido se denomina *pET24a-SapCg*.

Inducción en matraz de agitación

El constructo de expresión, *pET24a-SapCg*, se transforma en la cepa de expresión de *E. coli* competente BL21 (DE3) (Novagen) Se escogieron tres colonias (clones) y se ensayaron por la expresión de prueba inicial de Saposina C. Esta expresión a pequeña escala se llevó a cabo en matraces de agitación de 125 mL usando medio LB con kanamicina (50 mg/L) para clones BL21 (DE3). La inducción se consigue mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM cuando la DO_{600} de la célula alcanzó aproximadamente 0,6. Las muestras se toman inmediatamente antes y cuatro horas después de la inducción. La expresión de la proteína del tamaño correcto es similar para los tres clones BL21 (DE3). Se preparan soluciones madre de trabajo de glicerol para los tres clones. Se selecciona aleatoriamente un clon para su posterior desarrollo.

Condiciones de fermentación

El clon utilizado para la fermentación es *pET24a-SapCg* (descrito anteriormente) transformado en la cepa de expresión de *E. coli* y BL21 (DE3). La fermentación se lleva a cabo utilizando un fermentador NBSC BioFlow 3000 de 8 litros, y que consiste en fermentación por lotes con la estrategia de alimentación de DO-Stat. El volumen de cultivo inicial es de 5 litros. Los medios de dosificación y la composición del medio de alimentación se muestran en las Tablas 1 y 2. La temperatura de fermentación antes de la inducción es de 30°C. La inducción se lleva a cabo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM en la fase log tardía, acompañado de un cambio de temperatura a 37°C. La fermentación completa duró 22 horas, con inducción durante 10 horas.

Tabla 1-Medio por Lotes

	Componente	Cant./L	Unidad
1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	g
2	KH ₂ PO ₄	13,3	g
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2	g
4	Ácido cítrico	1,7	g
5	Extracto de levadura	2	g
6	Solución de metal en trazas	10	mL
7	Glucosa. H ₂ O	22	g
8	Volumen ajustado a 5 L con agua Tipo I, pH 6,8	Cantidad suficiente	mL

Tabla 2- Medios de alimentación

	Componente	Cant./	Unidad
1	D-glucosa-monohidratada	660	g
2	Extracto de levadura	60	g
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	20	g
4	Agua Tipo I	Cantidad suficiente	mL

Preparación de inclusión

Una preparación de cuerpos de inclusión se lleva a cabo usando pasta de la anterior fermentación. Se resuspenden aproximadamente 20 g de pasta en un total de 200 mL de regulador de lisis (Tris 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM). Después de la resuspensión y la homogeneización completa, se utiliza la microfluidización para romper las células. La parte insoluble del lisado celular se sedimenta por centrifugación durante 60 min a 16.000 xg a 4°C. Los sedimentos se homogeneizan en un total de 800 mL de regulador de lisis más 1% de Triton X-100 y se mezclan 45 minutos a temperatura ambiente. La centrifugación se lleva a cabo durante 60 minutos a 16.000 xg y 4°C. Se llevaron a cabo dos lavados más usando regulador de lisis con 1% de tritón X-100 y una vez usando regulador de lisis sin tritón X-100. Los sedimentos se vuelven a suspender en un total de 600 mL de urea 6 M pH 8,5 (regulado con Tris 20 mM) y se agitan a temperatura ambiente durante 3 h. La centrifugación se lleva a cabo durante 60 minutos a 16.000 xg y 4°C para clarificar la muestra. El sobrenadante resultante se utiliza para purificación adicional después de la confirmación de la presencia de Saposina C usando un anticuerpo específico de Saposina C.

Cromatografía y replegado de Saposina C

5 Las siguientes etapas de cromatografía, replegamiento y concentración se realizan en condiciones libres de endotoxina. La purificación de Saposina C a partir de cuerpos de inclusión se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando resina Q-sefarosa Fast Flow (GE Amersham). El regulador de equilibrio (regulador A) es urea 6 M/Tris 0,02 M, pH 8,5. El regulador de elución (regulador B) es urea 6 M/NaCl 1 M/Tris 0,02 M, pH 8,5. La elución se lleva a cabo inicialmente por gradiente escalonado, con 5% de regulador B/95% de regulador A para 10 volúmenes de columna, luego 10% de regulador B/90% de regulador A para 10 volúmenes de columna, seguido de un gradiente lineal desde 10% hasta 100% de regulador B sobre 10 volúmenes de columna. Todas las fracciones se recogen y se conservan. El análisis de las fracciones para la presencia de Saposina C se lleva a cabo mediante SDS-PAGE, y la fracción que contiene la mayoría de la Saposina C se elige para replegamiento.

15 El replegamiento se lleva a cabo mediante diálisis en regulador McIlvaine (ácido cítrico 0,05 M/fosfato 0,1 M, pH 4,7). La proteína Saposina C se concentra entonces hasta aproximadamente 0,2 mg/mL. Se determina que esta preparación es aproximadamente 90% pura por examen visual de SDS-PAGE.

REIVINDICACIONES

1. Composición para el uso terapéutico de suministro de un agente a través de una membrana biológica objetivo, caracterizada porque la composición aplicada a la membrana comprende

- 5
- a) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos de cadena larga, lípidos de cadena corta y mezclas de los mismos;
 - b) una cantidad segura y eficaz de un agente de formación de imágenes que tiene dos o más propiedades de formación de imágenes;
 - 10 c) una proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina; y
 - d) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en donde la concentración de la proteína o polipéptido fusogénico es de una cantidad suficiente para suministrar el agente a través de la membrana, y en donde la composición forma un liposoma capaz de fusionarse con la membrana biológica objetivo.

15

2. Composición para el uso terapéutico de suministro de un agente a través de una membrana biológica objetivo, caracterizada porque la composición aplicada a la membrana comprende

- 20
- a) uno o más fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos de cadena larga, lípidos de cadena corta y mezclas de los mismos;
 - b) una cantidad segura y eficaz de un agente de formación de imágenes;
 - c) una proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina; y
 - d) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

25

en donde el agente de formación de imágenes es un colorante PTIR que contiene tanto un fluoróforo como una fracción de Gd (III) que puede ser detectada mediante imagenología de resonancia magnética (IRM) o microscopía confocal de fluorescencia, donde la concentración de la proteína o polipéptido fusogénico es de una cantidad suficiente para suministrar el agente a través de la membrana, y en donde la composición forma un liposoma capaz de fusionarse con la membrana biológica objetivo.

30

3. Composición para el uso terapéutico de suministro de un agente farmacéutico o de formación de imágenes a través de una membrana de la barrera hematoencefálica, caracterizado porque la composición administrada a la membrana comprende

35

- a) fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos aniónicos de cadena larga, lípidos neutros de cadena larga, lípidos neutros de cadena corta, lípidos aniónicos de cadena corta y mezclas de los mismos;
- b) una cantidad segura y eficaz del agente farmacéutico o agente de formación de imágenes;
- c) una proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina; y
- 40 d) un vehículo farmacéuticamente aceptable,

40

en donde la concentración de los liposomas es de una cantidad suficiente para suministrar una cantidad segura y eficaz del agente farmacéutico a través de la membrana y en donde los fosfolípidos forman un liposoma que tiene una carga negativa total.

45

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los fosfolípidos son una mezcla de lípidos aniónicos de cadena larga y lípidos neutros de cadena larga.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los fosfolípidos son una mezcla de lípidos aniónicos de cadena larga, lípidos neutros de cadena larga y lípidos neutros de cadena corta.

50

6. La composición de la reivindicación 5, en la que el liposoma contiene fosfolípidos catiónicos.

7. La composición de la reivindicación 4, en la que la cantidad de lípido aniónico de cadena larga, lípido neutro de cadena larga y lípido de cadena corta se rige por la fórmula $([\text{lípido neutro de cadena larga}] + [\text{lípido aniónico de cadena larga}] / [\text{lípido de cadena corta}])$ es igual a aproximadamente 4.

55

8. La composición de la reivindicación 3, en la que el liposoma está compuesto por dioleoilfosfatidilserina, dipalmitoilfosfatidilcolina y hexanoilfosfatidilcolina, en donde la cantidad de lípido aniónico de cadena larga, lípido neutro de cadena larga y lípido de cadena corta se rige por la fórmula $([\text{lípido neutro de cadena larga}] + [\text{lípido aniónico de cadena larga}] / [\text{lípido neutro de cadena corta}])$ es igual a aproximadamente 4.

60

9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el pH de la composición está entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 2.

65

10. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la proteína o polipéptido fusogénico es saposina C.
- 5 11. La composición de la reivindicación 3, en la que la concentración de los liposomas está en al menos aproximadamente un exceso de 1 hasta aproximadamente 10 veces, en relación molar, con respecto a aquella de la proteína o polipéptido fusogénico derivado de prosaposina.
12. La composición de la reivindicación 8, en la que la relación molar de dioleoilfosfatidilserina con respecto a dipalmitoilfosfatidilcolina es de aproximadamente 10 a 1.
- 10 13. La composición de la reivindicación 4, en la que el valor q está entre 1 y 10.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente de formación de imágenes es uno o más seleccionados del grupo que consiste en resonancia magnética, fluorescencia o marcadores detectables de CT/PET.
- 15 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el agente de formación de imágenes tiene dos o más propiedades de formación de imágenes.
- 20 16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el agente de formación de imágenes es un colorante PTIR que contiene tanto un fluoróforo como una fracción de Gd(III) que puede ser detectada mediante imagenología de resonancia magnética (IRM) o microscopía confocal de fluorescencia.

Figura 1

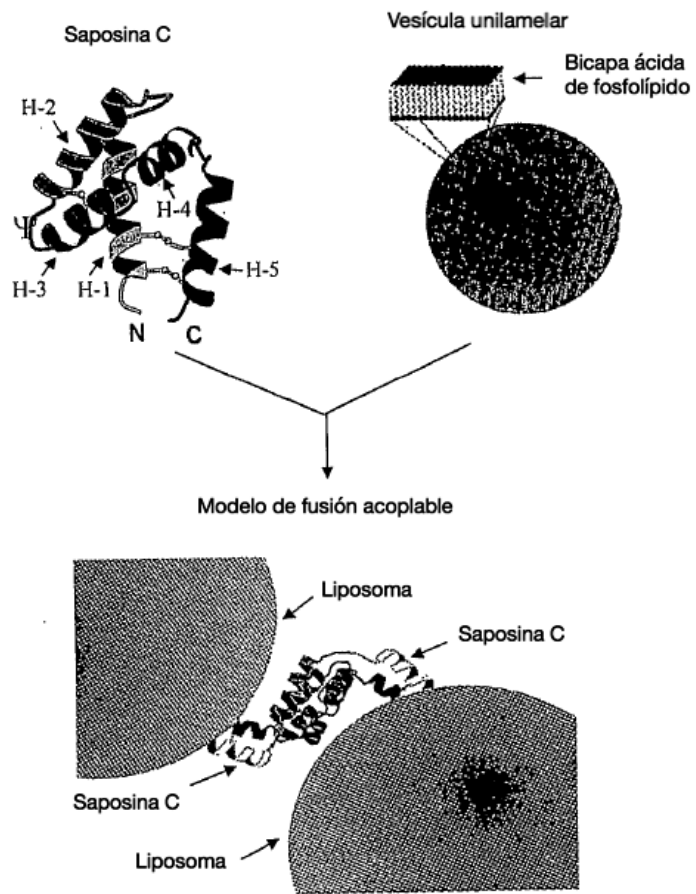


Figura 2

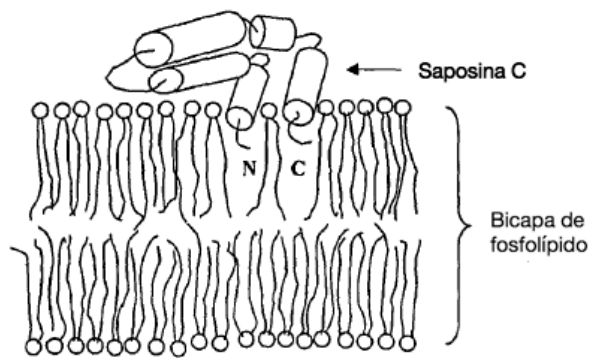


Figura 3

1 SDVYCEVCEFLVKEVTKLIDNNKTEKEILDAFDKMCSKLPKSLSEECQEVVDTYGSSILSILLEEVSPELVCSMLHLCG 80
LBR NR AR LBR

Figura 4

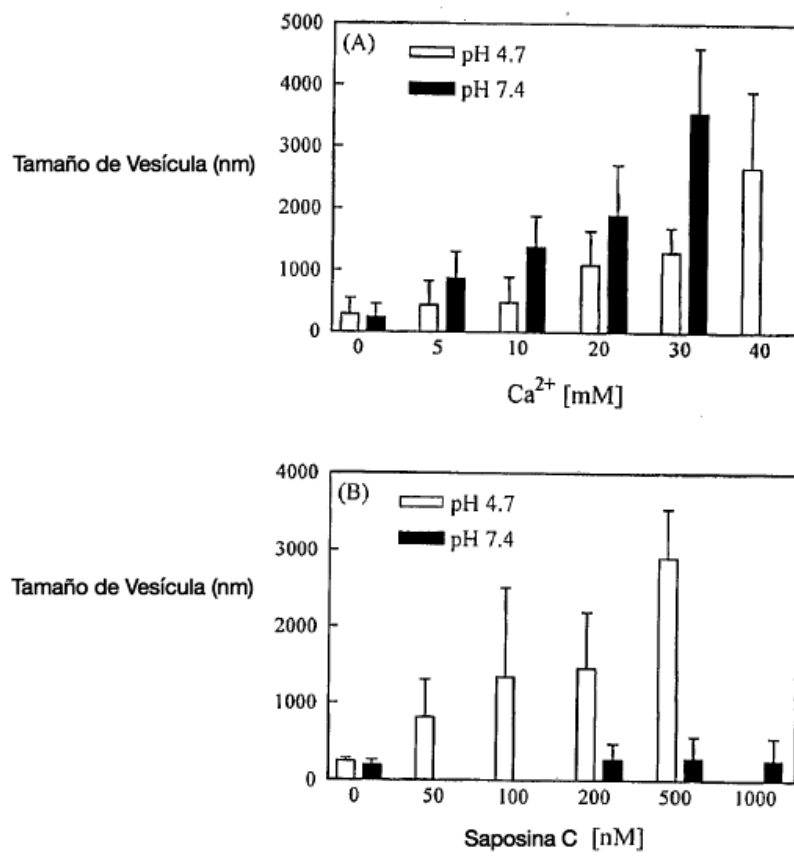


Figura 5

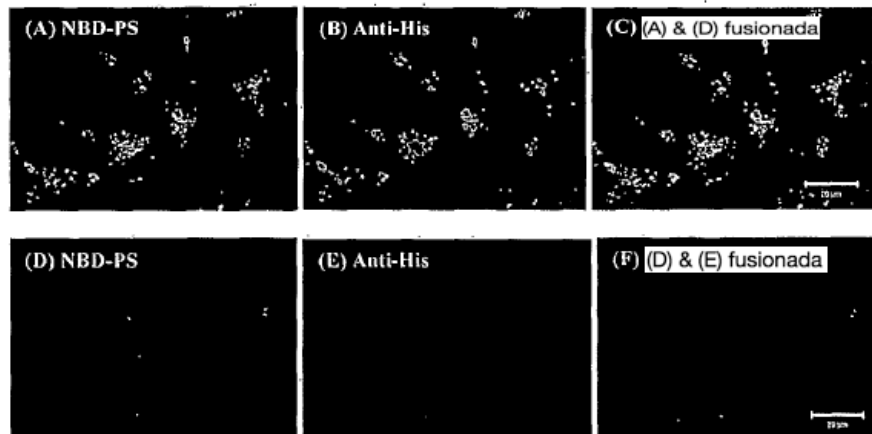


Figura 6

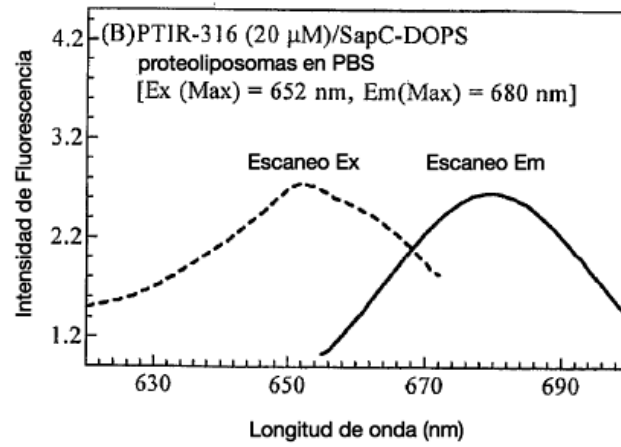
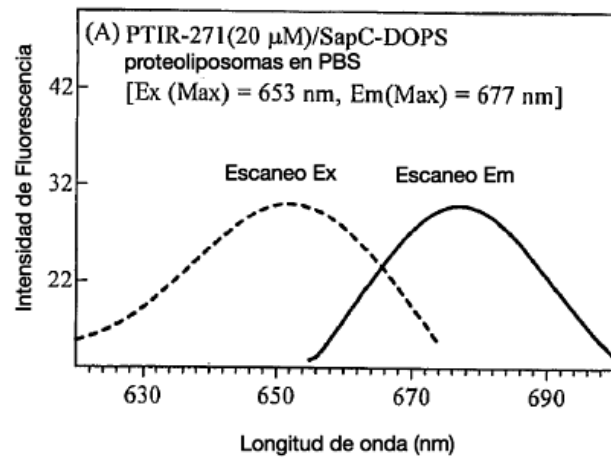


Figura 7

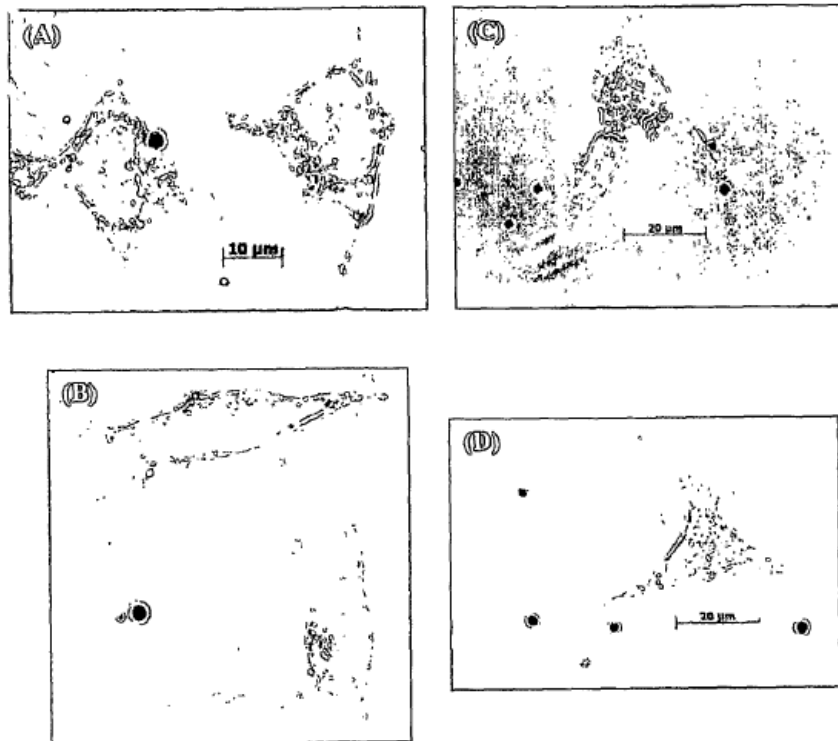
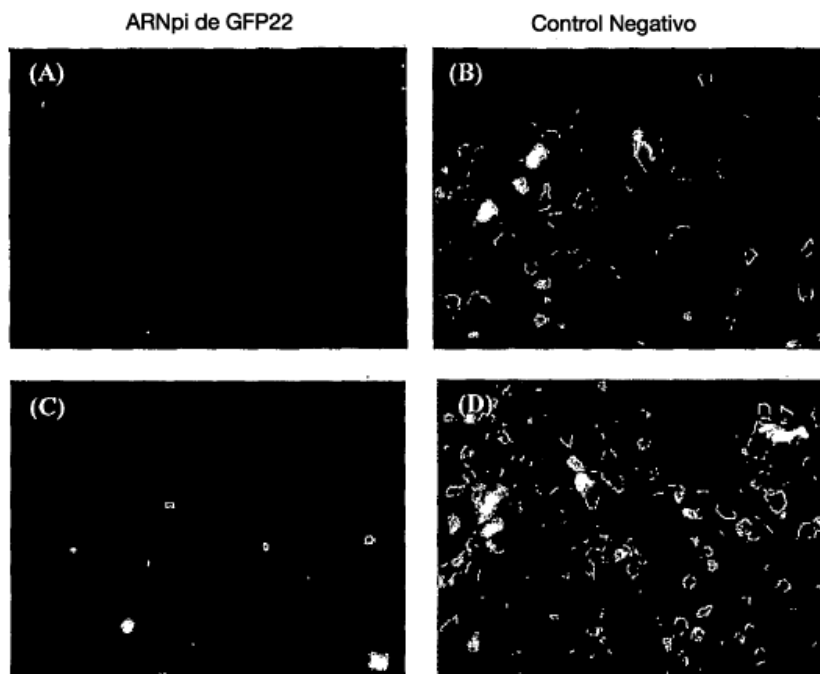


Figura 8

Suministro de ARNpi de GFP22 en células tumorales de mama de EGFP 4T1



lente 20X, exposición 800 ms, Photoshop: niveles de entrada 27, 1,19, 164, nivel de salida 255. Tamaño: 3X2,29 pulgadas

Figura 9

Suministro de ARNpi de GFP22 en células cancerosas de neuroblastoma humano (CHLA-20)

