

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 623**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2013 PCT/EP2013/063646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013 E 13732179 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2866839**

54 Título: **Liposomas funcionalizados útiles para la administración de compuestos bioactivos**

30 Prioridad:

29.06.2012 ES 201231020

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

17.01.2019

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (14.3%)
Serrano 117
28006 Madrid, ES;
FUNDACIÓ PARC CIENTÍFIC DE BARCELONA (14.3%);
CIBER CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (14.3%);
FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA (IRB BARCELONA) (14.3%);
UNIVERSITAT DE BARCELONA (14.3%);
FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (14.3%) y
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA (14.3%)**

72 Inventor/es:

**VENTOSA RULL, LEONOR;
VECIANA MIRÓ, JAUME;
CABRERA PUIG, INGRID;
ELIZONDO SÁEZ DE VICUÑA, ELISA;
MELGAREJO DÍAZ, MARTA;
ROYO EXPÓSITO, MIRIAM;
ALBERICIO PALOMERA, FERNANDO;
PULIDO MARTÍNEZ, DANIEL;
SALA VERGÉS, SANTIAGO;
CORCHERO NIETO, JOSÉ LUIS;
SCHWARTZ NAVARRO, SIMÓN;
ABASOLO OLAORTUA, IBANE y
VILLAVERDE CORRALES, ANTONIO PEDRO**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 696 623 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

Liposomas funcionalizados útiles para la administración de compuestos bioactivos

5 La presente invención se refiere a nuevos liposomas funcionalizados para la administración selectiva de principios activos. Estos liposomas, debido a su funcionalización con múltiples ligandos de guiado, pueden tener aplicaciones potenciales en cosmética y terapia.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los liposomas son vesículas que comprenden una bicapa lipídica similar a la de la célula. En su interior hay una solución acuosa en la que se pueden encontrar diferentes moléculas, tales como productos naturales, fármacos sintéticos o ácido nucleico. Estas vesículas se usan actualmente como transportadores y sistemas de administración molecular con muchas aplicaciones diferentes. Las aplicaciones típicas incluyen la administración de compuestos bioactivos en terapia o cosmética.

Los liposomas están en continua evolución, y algunos de los problemas asociados con su uso en una primera generación, como por ejemplo, una semivida corta en plasma o una unión no específica, se han resuelto parcialmente (Torchilin V. "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers". *Nature Rev. Drug Disc.* 2005, vol. 4, págs. 145-160). Con el objetivo de reducir la rápida eliminación de liposomas en la circulación, se han revestido con polímeros solubles, inertes y biocompatibles tales como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), que forma una capa protectora que ralentiza el reconocimiento por las opsoninas, aumentando por tanto su biodisponibilidad. En cuanto a la unión no específica, que podría producir la administración incorrecta de sus contenidos, se han sometido a ensayo un número creciente de ligandos funcionalizados sobre la superficie de los liposomas, en un intento de transformarlos en sistemas de administración específicos. Estas moléculas directoras pueden variar desde moléculas pequeñas tales como folato o biotina, a péptidos o incluso anticuerpos.

Se han descrito también liposomas funcionalizados simultáneamente con polímeros de revestimiento y un ligando de guiado, con el objetivo de intentar conseguir una vida media más larga y al mismo tiempo una administración más eficaz y selectiva de su contenido. De este modo, por ejemplo, se han descrito liposomas donde uno de los fosfolípidos de membrana (distearoilfosfatidiletanolamina, o DSPE) se ha usado como anclaje para la unión covalente de una cadena de polietilenglicol (PEG) que, a su vez, se ha usado para anclar covalentemente un ligando de guiado, en este caso, un péptido RGD cíclico (Dubey P., et. al. "Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting". *J. Drug Targ.* 2004, vol. 12, págs. 257-264). En el estado de la técnica, se encuentran otras referencias que divulgan liposomas con conjugados del tipo fosfolípido-PEG-[ligando de guiado]. Por ejemplo, se han descrito liposomas con conjugados del tipo DSPE-PEG-AG73 (Negishi Y., et. al. "Preparation and characterization of laminin-derived peptide AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool". *Biol. Pharm. Bull.* 2010, vol. 33, págs. 1766-1769). AG73 es un péptido derivado del dominio globular de la cadena $\alpha 1$ de la laminina, que se sabe que se une a sindecán-2, un receptor que se expresa en exceso en algunos cánceres.

Aunque se han usado fosfolípidos como puntos de anclaje, se han explorado otros constituyentes de los liposomas, especialmente colesterol. De este modo, por ejemplo, se encuentran referencias que describen conjugados del tipo colesterol-PEG-[ligando de guiado]. Se ha descrito un conjugado de colesterol-PEG-cetuximab para la administración de compuestos de boro en células cancerosas que expresan en exceso el receptor de cetuximab, EGFR (Pan X., et. al. "Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR". *Bioconjugate Chem.* 2007, vol. 18, págs. 101-108). Otro ejemplo del estado de la técnica es el conjugado del tipo colesterol-PEG-RGD para la administración selectiva de ADN codificante en la terapia génica a células que expresan en exceso la integrina $\alpha v \beta 3$ (Thomson B., et. al. "Neutral post grafted colloidal particles for gene delivery". *Bioconj. Chem.* 2005, vol. 16, págs. 608-614).

Se debe señalar que la unión covalente entre el colesterol de la membrana del liposoma y el tándem PEG-[ligando de guiado] en todas estas referencias se consigue mediante un enlace de tipo éster o carbamato.

Por otra parte, se han descrito liposomas que se han funcionalizado con otros grupos. En particular, se han descrito liposomas funcionalizados con conjugados en los que el colesterol está unido al PEG mediante un vinil éter (denominado CVEP) (Boomer J., et. al. "Cytoplasmic delivery of liposomal contents mediated by an acid-labile cholesterol-vinyl ether-PEG conjugate" *Bioconj. Chem.* 2009, vol. 20, 47-69). El grupo vinil éter se escinde en medio ácido, dando como resultado la pérdida del revestimiento de PEG. Estos liposomas contienen adicionalmente un segundo conjugado de DSPE-PEG-folato que los dirige a células que expresan en exceso el receptor de folato.

Aunque se han resuelto parcialmente algunos problemas técnicos asociados con el uso de liposomas, sigue existiendo la necesidad de conjugados que transmitan mejores propiedades fisicoquímicas y farmacológicas a los liposomas transportadores.

65

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a liposomas que transportan un conjugado basándose en la funcionalización de un esteroles presente en su bicapa lipídica con una cadena de polietilenglicol que, a su vez, se funcionaliza con un péptido. La unión entre la molécula de colesterol y el PEG se realiza mediante un grupo alquil éter, a diferencia de los del estado de la técnica que utilizan otros grupos químicos, tales como carbamato. Este nuevo enlace covalente transmite a los liposomas que transportan los conjugados propiedades fisicoquímicas y de administración mejoradas. En particular, los inventores han descubierto que los liposomas que transportan conjugados con un enlace éter demuestran una estabilidad en suspensión superior a la de los liposomas que transportan conjugados con un enlace carbamato. Es decir, los conjugados con el enlace éter tienen una velocidad de sedimentación más lenta que los que tienen el colesterol y la cadena de PEG está unida mediante un carbamato. Esto conlleva que los liposomas con conjugados de la presente invención son más estables en suspensión que los descritos en el estado de la técnica. Se debe señalar que no hay referencias en el estado de la técnica que sugieran que este tipo de enlace covalente de tipo éter pueda transmitir dicha estabilidad en suspensión.

Por otra parte, los inventores han descubierto sorprendentemente que los conjugados de tipo colesterol-(éter)-PEG-[ligando de guiado] transmiten a los liposomas un tamaño de partícula más homogéneo que el transmitido por los conjugados del tipo colesterol-(carbamato)-PEG-[ligando de guiado]. El último demuestra una distribución de tamaño de partícula bimodal, mientras que los de la invención tienen una distribución monomodal más homogénea.

Las propiedades fisicoquímicas de homogeneidad y menor velocidad de sedimentación de los liposomas que tienen los conjugados de la invención puede ser una ventaja en la producción, manipulación y uso de los liposomas funcionalizados con agentes terapéuticos.

Adicionalmente, se ha descubierto sorprendentemente que los liposomas que transportan los conjugados de la invención tienen propiedades mejoradas en la administración de sus contenidos. De este modo, los liposomas que llevan conjugados con un enlace éter que conecta el colesterol y el PEG tienen una administración superior de sus contenidos a las células diana que los liposomas que llevan conjugados con un enlace carbamato que conecta el colesterol y el PEG.

De este modo, un primer aspecto de la presente invención es proporcionar un conjugado que comprende: i) un esteroles; ii) una cadena de polietilenglicol que tiene un extremo proximal y un extremo distal donde dicha cadena de polietilenglicol está unida covalentemente por su extremo proximal a i) mediante un enlace de tipo alquil éter; iii) un ligando de guiado, capaz de unirse selectivamente a uno o varios receptores presentes en una célula diana, estando dicho ligando de guiado unido covalentemente al extremo distal de ii), en el que dicho ligando de guiado es un péptido.

En una realización preferida, el conjugado de la presente invención es uno en el que el esteroles es colesterol.

En otra realización preferida, el conjugado es uno en el que la cadena del polietilenglicol tiene un número de repeticiones de 1 a 30. En otra realización más preferida, la cadena del polietilenglicol tiene un número de repeticiones de 2 a 10.

En otra realización más preferida, el péptido comprende la secuencia RGD. En otra realización aún más preferida, el péptido es un péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1: RGDfK, en la que los residuos RGD y K son L-aminoácidos y el residuo f es un D-aminoácido.

Los péptidos RGD son péptidos descritos habitualmente en la técnica como péptidos que son capaces de interactuar con las integrinas presentes en la membrana de varias líneas de células, y son de especial interés para el estudio de la adhesión celular, tanto entre células como entre células y diferentes tejidos de la membrana basal. El péptido RGD usado en los ejemplos descritos, tanto en el conjugado que forma parte de la invención (enlace éter) como en el estado de la técnica más cercana (enlace carbamato), es un péptido con la secuencia RGDfK, en la que la fenilalanina es el único D-aminoácido (este es el motivo por el que se ha distinguido en la secuencia con una letra en minúsculas), y en el que el enlace covalente con el polietilenglicol se ha realizado funcionalizando la cadena lateral de la lisina.

Un segundo aspecto de la presente invención es un liposoma que comprende un conjugado como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, el liposoma que se ha definido anteriormente tiene una distribución del tamaño de partícula monomodal.

En otra realización preferida, el liposoma que se ha definido anteriormente tiene un tamaño de partícula promedio de 25 hasta 500 nanómetros, y el potencial Z promedio en valor absoluto es de 20 hasta 90 mV.

En otra realización preferida, el liposoma que se ha definido anteriormente comprende además un agente terapéutico.

En una realización más preferida, el agente terapéutico es la α -galactosidasa (o GLA para abreviar).

Un tercer aspecto de la presente invención es el liposoma anteriormente definido para su uso como sistema de administración ("delivery system") para agentes terapéuticos.

5 Un cuarto aspecto de la presente invención está relacionado con los liposomas anteriormente definidos para su uso como medicamento.

10 Un quinto aspecto de la invención está relacionado con el uso del liposoma que comprende el agente terapéutico α -galactosidasa para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

Esta realización preferida se puede reformular como un liposoma que comprende el agente terapéutico α -galactosidasa para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Fabry.

15 La invención también describe un método para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Fabry, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los liposomas que se han definido anteriormente, junto con excipientes o transportadores farmacéuticamente aceptables, a un sujeto necesitado de dicho tratamiento, incluyendo un ser humano.

20 Un sexto aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los liposomas definidos anteriormente junto con excipientes y/o transportadores farmacéuticamente aceptables.

25 Un séptimo aspecto de la presente invención es proporcionar un método para la preparación del conjugado que se ha definido anteriormente que comprende las siguientes etapas:

- a) hacer reaccionar un esteroil con haluro de sulfonilo en presencia de una base y un disolvente para proporcionar el correspondiente éster de sulfonilo;
- 30 b) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa a) con un polietilenglicol con un número de repeticiones de 2 a 10 en presencia de un disolvente;
- c) activar el compuesto obtenido en la etapa b) con carbonato de disuccinimidilo; d) hacer reaccionar el compuesto resultante de la etapa c) con un péptido que comprende la secuencia RGD en presencia de una base y un disolvente. Preferentemente, el éster de sulfonilo es un mesilato, besilato, o tosilato.

35 Un octavo aspecto de la presente invención es proporcionar un método para la preparación de los liposomas que se han definido anteriormente que comprende las siguientes etapas:

- a) Preparar una solución acuosa que puede incluir opcionalmente un tensioactivo;
- 40 b) Preparar una solución que comprende el conjugado que se ha definido anteriormente, colesterol y, opcionalmente, un fosfolípido disuelto en un disolvente orgánico, donde la solución orgánica se expande con un fluido comprimido;
- c) Opcionalmente, añadir un agente terapéutico bien a la solución de la etapa a), o a la solución de la etapa b) antes de expandir la solución; y d) despresurizar la solución resultante de la etapa b) sobre la solución resultante de la etapa a). Preferentemente, los tensioactivos son sales de amina ternaria, sal de amonio cuaternario y alquilamonios en heterociclos saturados e insaturados. Además, preferentemente los fluidos comprimidos son dióxido de carbono (CO₂), etano, propano, los hidroclorofluorocarbonos (por ejemplo, CFC-22) y los hidrofluorocarbonos (por ejemplo, HFC-134A).

50 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, el término "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, el término "comprende" abarca el caso de "consiste de". Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención surgirán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan como ilustración y no se pretende que sean una limitación de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones concretas y preferidas indicadas en el presente documento.

55 **Definiciones**

Los términos "liposoma" y "vesícula", como se usan en el presente documento, son indistintos. Para los expertos en la técnica, se entiende normalmente que una vesícula que se denomina liposoma tenga algún fosfolípido presente en su membrana, aunque el término vesícula también se utiliza cuando el liposoma carece de fosfolípidos. En cualquier caso, los conjugados que forman parte de la invención se puede incluir en vesículas que contienen o que carecen de fosfolípidos.

65 El término "alfa-galactosidasa" (GLA para abreviar) como se usa en el presente documento, se refiere a la enzima glucósido hidrolasa que hidroliza los restos finales de alfa-galactosilo de los glicolípidos y glicoproteínas. Está

codificada por el gen GLA. Hidroliza predominantemente la ceramida trihexósido, y puede catalizar la hidrólisis de melobiosa en galactosa y glucosa. Como se entiende en la presente memoria, GLA puede significar una alfa-galactosidasa clonada y expresada tanto en procariotas como en eucariotas, una enzima GLA truncada, o derivados de GLA que siguen reteniendo su actividad catalítica original.

5

La expresión "agente terapéutico" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de sustancia, molécula o mezclas de sustancias o de moléculas que se van a administrar para tener un efecto beneficioso y que están encapsuladas, atrapadas o complejadas en el liposoma.

10

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un compuesto que, cuando se administra, es suficiente para evitar el desarrollo, o aliviar de alguna forma, uno o más síntomas de una enfermedad o dolencia. La dosis particular del compuesto administrado de acuerdo con la presente invención se puede ajustar evidentemente según las circunstancias asociadas con cada caso, incluidos compuesto administrado, la vía de administración, la enfermedad que se está tratando, y consideraciones análogas.

15

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a la mezcla de vesículas que se divulgan en el presente documento junto con otros componentes químicos, por ejemplo disolventes. La composición farmacéutica facilita la administración de vesículas que transportan el agente farmacéutico al organismo.

20

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como por ejemplo una carga sólida o líquida, excipiente, disolvente o material de encapsulación. Cada componente debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con resto de ingredientes de la composición farmacéutica. Debe ser adecuado para su uso en contacto con tejidos u órganos de los seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación o respuesta alérgica, inmunogenicidad u otros problemas o complicaciones en concordancia con una relación riesgo/beneficio razonable.

25

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a aliviar o erradicar una enfermedad o dolencia, aliviar o erradicar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o dolencia, o aliviar o erradicar la causa de la enfermedad o dolencia.

30

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Montaje que ilustra el método para la preparación de las vesículas de la invención (Abreviaturas: R: Recipiente presurizado; V: Válvula; P: Bomba; F: Caudalímetro; H: Intercambiador de calor; ST: Agitador; FL: Filtro; TI: Indicador de temperatura; PIC: Indicador y controlador de presión; C: Colector; RD: Disco de ruptura)

35

FIG. 2. Distribución del tamaño de partícula de las vesículas que contienen los conjugados de la invención (con enlace éter, línea discontinua) y las vesículas que contienen los conjugados con enlace carbamato (línea continua). En la figura se muestra que la primera tiene una distribución monomodal, mientras que la última muestra una distribución bimodal menos homogénea.

40

FIG. 3. Imágenes confocales que muestran los resultados de los experimentos de internalización para los liposomas que no llevan conjugado, que llevan DPPC:Col:Col-PEG-RGD(éter) y que llevan DPPC:Col:Col-PEG-RGD(carbamato). Las columnas izquierda, central y derecha corresponden a Transmisión (Células), Canal verde (Lisomas) y Canal rojo (DiD) respectivamente. Las filas superior, central e inferior corresponden a DPPC:Col:Col-PEG-RGD(éter), DPPC:Col:Col-PEG-RGD(carbamato) y DPPC:Col respectivamente.

45

FIG. 4. Muestra la intensidad de fluorescencia asociada con las células que han internalizado los liposomas marcados con DID. Se ha mostrado que esta internalización es significativamente mayor cuando se utilizan liposomas que tienen DPPC:Col:Col-PEG-RGD(éter) que cuando se usan liposomas que tienen DPPC:Col:Col-PEG-RGD(carbamato) y DPPC:Col.

50

El eje y muestra la Intensidad de fluorescencia (u.a.). En el eje x: el valor de la izquierda, valor central y valor de la derecha corresponden a liposomas puros, liposomas con el conjugado DPPC:Col:Col-PEG-RGD(éter) y liposomas con el conjugado DPPC:Col:Col-PEG-RGD(carbamato) respectivamente.

55

FIG. 5. Actividad alfa galactosidasa de los liposomas en los cultivos de MAEC procedentes de ratones deficientes en alfa galactosidasa, a una concentración de 1,5 µg/ml de enzima. El eje y representa gráficamente % pérdida de Gb3 (media +/- desviación estándar). En el eje x: el punto 1 corresponde a alfa-galactosidasa (sin encapsulación en liposomas), el punto 2 corresponde a liposomas funcionalizado (con conjugados unidos tanto a éter como a carbamato) y el punto 3 corresponde a los liposomas funcionalizados que se han diafiltrado.

60

FIG. 6. Efecto de los liposomas que llevan conjugados diafiltrados que tienen alfa-galactosidasa a diferentes concentraciones sobre la pérdida de Gb3 en células endoteliales deficientes en alfa-galactosidasa. El eje x muestra el % de pérdida de Gb3 mientras que el eje y muestra la concentración de alfa-galactosidasa (µg/ml). La línea con

65

los puntos negros llenos corresponde a los liposomas que llevan conjugados con el enlace carbamato, mientras que la línea con cuadrados blancos corresponde a los liposomas que llevan conjugados con el enlace éter.

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Preparación de conjugados

Los conjugados que forman parte de la invención (con un enlace éter entre el colesterol y el PEG), y aquellos que se han descrito en el estado de la técnica (con un enlace carbamato entre el colesterol y el PEG) se sintetizaron con las etapas detalladas a continuación. Los acrónimos utilizados en el resumen experimental son:

10

ACN: Acetonitrilo.

CDI: 1, V-Carbonil diimidazol

DCM: Diclorometano

DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina

15

DMF: N,N-Dimetilformamida

DSC: Carbonato de disuccinimidilo

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas

HPLC-PDA: Cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas- detector de matriz de fotiodos

20

RMN: Resonancia magnética nuclear

TMBE: Metil terc-butil éter

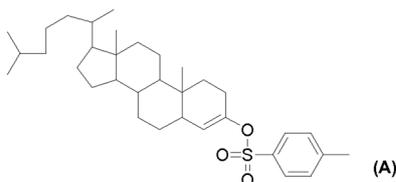
TFA: Ácido trifluoroacético

TIS: Triisopropilsilano

25 Ejemplo 1a: Preparación de conjugados con enlace éter:

25

Preparación de colesterol tosilo (A):



30

En un matraz, se introdujo el colesterol (1 eq., 1,006 g), se disolvió en piridina anhidra (12 ml). A continuación se añadió cloruro de tosilo (2 eq., 1,004 g) y la solución se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. A la solución se añadieron 5 ml de agua, y el producto en bruto se extrajo con DCM (3x6 ml). Et₂O (solución total) se añadió a la fase orgánica, y a continuación se secó con MgSO₄, se filtró, y el disolvente se eliminó a sequedad. El producto bruto se recrystalizó en éter de petróleo, obteniéndose un sólido de color blanco (0,969 g, 70%).

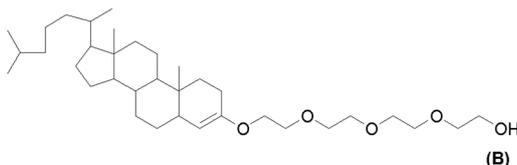
35

HPLC-PDA: (C18, 5-100 % B, A: ACN B: MeOH, 4,5 min, 2 ml/min, λ = 210 nm) T_r: 2,7 min (89%) RMN ¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,65 (s, 3H); 0,85 (d, 1,6 Hz, 3H); 0,87 (d, 2 Hz, 3H); 0,90 (d, 6,8 Hz, 3H); 0,96 (s, 3H); 2,44 (s, 3H); 5,3 (m, 1H); 7,33 (d, 8,0 Hz, 2H); 7,79 (d, 8,3 Hz, 2H). RMN ¹³C: (100 MHz, CDCl₃) δ: 144,52 (C32), 139,00 (C4), 134,85 (C35), 129,87 (C34, C36), 127,77 (C33, C37), 123,65 (C7), 82,54 (C2), 56,79 (C11), 56,25 (C17), 50,05 (C10), 42,43 (C12), 39,80 (C22), 39,65 (C13), 39,01 (C3), 37,03 (C5), 36,49 (C20), 36,31 (C18), 35,89 (C6), 31,99 (C9), 31,89 (C8), 28,77 (C1), 28,33 (16), 28,15 (C15), 24,38 (C23), 23,95 (C21), 22,95 (C25), 22,70 (C24), 21,77 (C38), 21,13 (C14), 19,28 (C26), 18,84 (C19), 11,98 (C27).

40

Preparación de Colesterol-tetraetilenglicol (B):

45



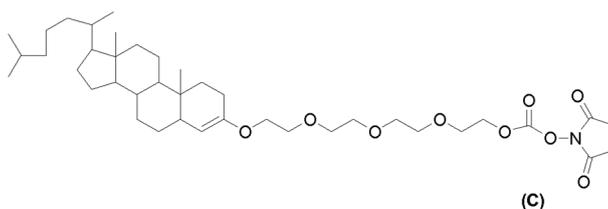
50

En un matraz, se añadieron 0,503 g de colesterol tosilo (A) y se disolvieron en 5 ml de 1,4-dioxano anhidro. 3,591 g de tetraetilenglicol (20 eq.) se añadieron a esta solución, y la mezcla se hizo reaccionar durante 4 h a temperatura de reflujo bajo atmósfera de argón. La solución resultante se concentró a sequedad y después se disolvió en 20 ml de DCM y se lavó con 2 x 20 ml de solución saturada de NaHCO₃, 3 x 20 ml H₂O, 1 x 20 ml de solución saturada de NaCl. Las fases acuosas resultantes se volvieron a extraer con 20 ml de DCM. Finalmente, tras combinarlas, las fases

orgánicas se secaron con MgSO_4 , se filtraron, y el disolvente se evaporó a sequedad. La purificación del producto bruto se llevó a cabo por cromatografía con alúmina básica (DCM al 0-5% en MeOH). Se obtuvieron 0,260 g de producto en forma de un aceite amarillento (50%).

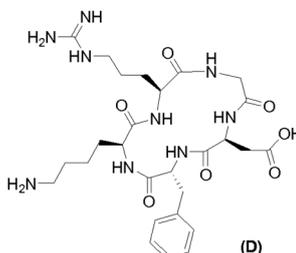
- 5 HPLC-PDA: (C_{18} , 5-100% B, A: ACN B: MeOH, 4,5 min, 2 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r : 2,6 min (73% 210 nm). RMN ^1H : (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,67 (s, 3H); 0,85 (d, 1,6 Hz, 3H); 0,87 (d, 1,6 Hz, 3H); 0,91 (d, 6,4 Hz, 3H); 0,99 (s, 3H); 3,18 (m, 1H); 3,67 (m, 16H). RMN ^{13}C : (100 MHz, CDCl_3) δ : 141,07 (C4), 121,71 (C7), 79,69 (C2), 72, 82-70, 40 (C30, C32, C33, C35, C36, C38), 67,36 (C29), 61,87 (C39), 56,93 (C11), 56,30 (C17), 50,33 (C10), 42,47 (C12), 39,93 (C22), 39,66 (C13), 39,11 (C3), 37,37 (C5), 37,01 (C6), 36,33 (C20), 35,92 (C18), 32,09 (C8), 32,04 (C9), 28,43 (C1), 28,37 (C16), 28,15 (C15), 24,43 (C23), 23,97 (C21), 22,96 (C24), 22,70 (C25), 21,21 (C14), 19,51 (C26), 18,86 (C19), 12,00 (C27).

Preparación de Colesterol-tetraetilenglicol-DSC (C):



- 15 El compuesto B (1 eq., 0,2746 g) se disolvió en 9 ml de una mezcla de DCM:ACN:DIPEA (1:1:1) y se añadió DSC (3 eq., 0,2746 g). La mezcla se agitó bajo atmósfera de argón y después de 16 h, se notó la desaparición de producto de partida B. El disolvente se evaporó a sequedad, y el producto bruto se disolvió en 5 ml de DCM. Esta fase orgánica se lavó con 5 ml agua. La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró, y finalmente, el disolvente se evaporó a sequedad.
- 20 El producto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

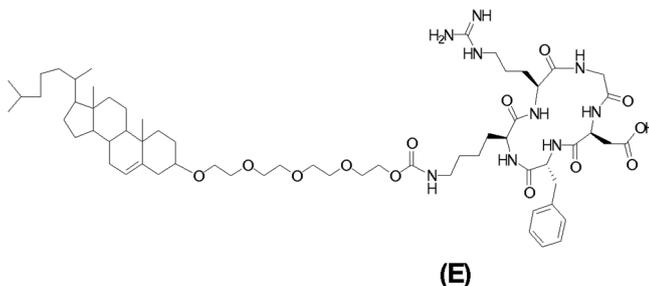
Preparación de cRGDfK (D):



- 25 La síntesis del péptido D se llevó a cabo como se describe en Dai X., et. al. "An improved synthesis of a selective $\alpha\text{v}\beta_3$ -integrin antagonist cyclo (-RGDfK)" Tetrahedron Letters 2000, vol. 41, págs. 6295-6298, con modificaciones poco importantes. En resumen, el péptido cíclico final se desprotegió con una mezcla de TFA/TIS/ H_2O (95:2,5:2,5) y se purificaron mediante RP-HPLC, obteniendo del péptido D (180,9 mg, 15%) en forma de un sólido de color blanco.
- 30 HPLC-MS: (C_{18} , 5-100% B, A: ACN B: NH_4HCO_3 20 mM, 3,5 min, 1,6 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r : 2,47 min, $m/z = 604,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, Masa calculada: 603,67 (99% 210 nm). MALDI-TOF (ACH): 604,24 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: Asp: 0,673, Gly: 0,734, Arg: 0,780, Lis: 0,677, Phe: 0,632

Preparación de Colesterol-cRGDfK (E):

35



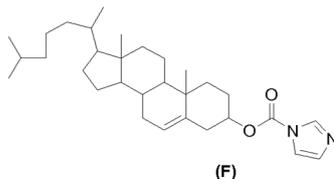
El Compuesto C (1,5 eq., 69,00 mg) se disolvió en 5 ml de DMF anhidro y se añadieron DIPEA (2 eq., 32 μl) y péptido

D (1 eq., 65,95 mg). La reacción se dejó en agitación durante 16 h hasta la desaparición del péptido D (control mediante HPLC-MS). El disolvente se retiró y el producto en bruto se precipitó con TMBE (3x). El compuesto E se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (55,5 mg, 74%). HPLC-MS: (Symmetry300 C₄, 5-100% B, A: ACN B: H₂O, 30 min, 1 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r: 17,31 min, m/z = 1192,8 [M+H]⁺, Masa calculada: 1192,53. HPLC-PDA: (C₄, 5-100% B, A:

ACN B: H₂O, 30 min, 1 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r: 20,1 min (98% 210 nm). ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: Asp: 0,99, Gly: 1,18, Arg: 1,15, Lis: 0,92, Phe: 1,04

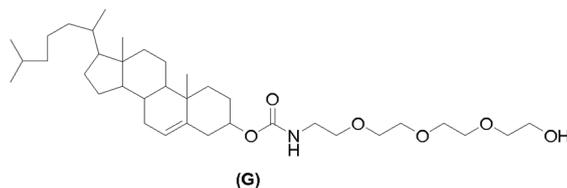
Ejemplo 1b (comparativo con el Ejemplo 1a): Preparación de conjugados con enlace carbamato:

Preparación de Colesterol-DCI (F):



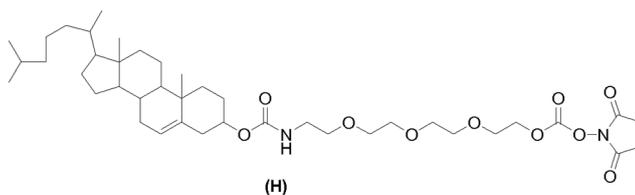
El colesterol (1 eq., 200,2 mg) se disolvió en 9 ml de una mezcla de DCM/DIPEA/ACN (1:1:1) y a esto se añadió CDI (10 eq., 852,1 mg). Se dejó reaccionar durante la noche, y se observó el aspecto del producto deseado. El disolvente se evaporó a sequedad y el producto en bruto se disolvió en 5 ml de DCM. Esta fase orgánica se lavó con 5 ml agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró, y finalmente, el disolvente se evaporó a sequedad. El producto bruto se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Preparación de Colesterol-tetraetilenglicol carbamato (G):



El compuesto (1 eq., 109,6 mg) se capturó y se disolvió en DCM, a esta solución se añadió 1-amino-3,6,9-trioxaundecanil-11-ol (4,5 eq., 152,8 mg) y a continuación la solución se ajustó a pH 8 usando DIPEA. La mezcla de se dejó reaccionar, controlando su progreso mediante HPLC-MS, hasta que se observó la desaparición del producto de partida F. El producto bruto se lavó haciendo extracciones de la fase orgánica con agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró, y finalmente, el disolvente se evaporó a sequedad. El producto bruto final se purificó mediante columna de gel de sílice (AcOEt isocrático) para obtener 80,2 mg de compuesto G en forma de un aceite de color amarillento (60%). HPLC-MS: (XSelect C₁₈, 5-100% B, A: ACN B: MeOH, 4,5 min, 2 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r: 1,87 min m/z = 606,47 [M+H]⁺, Masa calculada: 605,89. HPLC-PDA: (C₄, 5-100% B, A: ACN B: H₂O, 30 min, 1 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r: 21,8 min (95% 210 nm) RMN ¹H: (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,680 (s, 3H); 0,86 (d, 1,8 Hz, 3H); 0,87 (d, 1,8 Hz, 3H); 0,91 (d, 6,5 Hz, 3H); 1,01 (s, 3H); 3,36 (m, 1H); 3,65 (m, 16H). RMN ¹³C: (100 MHz, CDCl₃) δ : 156,58 (C29), 140,07 (C4), 122,53 (C3), 70,74 (C8), 70,56-70,25 (C33, C35, C36, C38, C39, C41), 61,79 (C42), 56,83 (C14), 56,27 (C15), 50,15 (C6), 42,45 (C13), 40,85 (C32), 39,88 (C22), 39,66 (C12), 38,75 (C7), 37,15 (C5), 36,71 (C10), 36,32 (C20), 35,93 (C18), 32,05 (C1), 32,02 (C2), 28,37 (9), 28,35 (C17), 28,15 (C16), 24,43 (C23), 23,97 (C21), 22,96 (C24), 22,70 (C25), 21,18 (C11), 19,48 (C19), 18,85 (C27), 12,00 (C26).

Preparación de Colesterol-tetraetilenglicol-DSC carbamato (H):

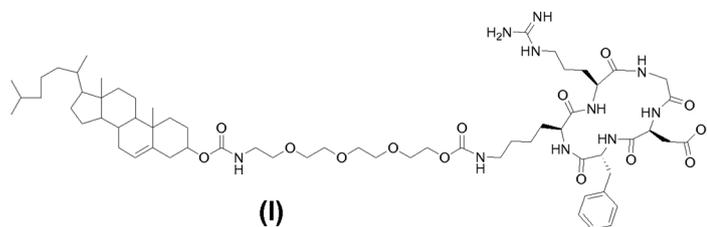


El compuesto G (1 eq., 80,2 mg) se capturó y se hizo reaccionar con DSC (10 eq., 316,8 mg) en 9 ml de una mezcla DCM/DIPEA/ACN (1:1:1) durante 16 h. Se detectó la desaparición del compuesto G, el disolvente se evaporó a

sequedad y el producto en bruto se disolvió en 5 ml de DCM y se lavó con agua. La fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró, y el disolvente se evaporó, obteniendo un producto bruto listo para usar sin ninguna purificación adicional.

Preparación de Colesterol-cRGDfK carbamato (I):

5



La totalidad del compuesto H se disolvió en DMF anhidro y se añadieron DIPEA (2 eq., 60 μ l) y péptido D (1 eq., 512 mg). La reacción se dejó en agitación durante 16 h hasta la desaparición del péptido D (control mediante HPLC-MS). El disolvente se retiró, y el producto bruto se precipitó en TMBE (3 x), finalmente se lavó con agua. De esta forma, se obtuvieron 17 mg del producto I en forma de un sólido de color blanco.

10

HPLC-MS: (XSelect C_{18} , 5-100% B, A: ACN B: MeOH, 4,5 min, 2 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r : 1,03 min, $m/z = 1235,94$ $[M+H]^+$, Masa calculada: 1235,55.

15

HPLC-PDA: (C_4 , 5-100% B, A: ACN B: H_2O , 30 min, 1 ml/min, $\lambda = 210$ nm) T_r : 19,91 min (86% 210 nm). ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS: Asp: ND, Gly: 1,23, Arg: 1,11, Lis: ND, Phe: 1,11.

Ejemplo 2. Método general para la preparación de vesículas

20

Las vesículas que transportan los conjugados de la invención (enlace éter) o los conjugados del estado de la técnica (enlace carbamato) se prepararon como se describe a continuación, basado en un procedimiento descrito en otra parte (Cano-Sarabia, M. et. al. "Preparación de Uniform Rich Cholesterol Unilamellar Nanovesicles Using CO_2 -Expanded Solvents" Langmuir 2008, vol. 24, págs. 2433-2437).

25

El método para la preparación de las vesículas se llevó a cabo en un montaje tal como se representa en la Fig. 1. El montaje consistió en un reactor (R) de alta presión al que se añadió una solución con los componentes de la membrana de la vesícula en etanol a una determinada concentración ($C_1, C_2 \dots C_n$ dependiendo del número de componentes), a presión atmosférica y a la temperatura y presión ($T_w = T$). En una segunda etapa, se añadió CO_2 a la presión de trabajo ($P_w = P$), proporcionando la expansión volumétrica de la solución hasta una relación molar X_{CO_2} . La adición se llevó a cabo usando la bomba P1 mediante la válvula V-1, manteniendo cerradas el resto de las válvulas. El sistema se mantuvo a una presión P y temperatura T durante una determinada cantidad de tiempo para garantizar la homogeneización total y el equilibrio térmico. Transcurrido este tiempo, V-4 se abrió con el fin de conectar el reactor R con el filtro FL, previamente presurizado con N_2 hasta P_w , manteniendo cerradas el resto de las válvulas. La apertura de V-6 permite la despresurización de la solución volumétricamente expandida de una solución acuosa bombeada a través de P2. En esta etapa final, una corriente de N_2 añadida mediante V-2 a P_w se usó como émbolo para empujar la solución expandida, y para mantener la presión de trabajo constante en el reactor durante la etapa de despresurización. La presencia del filtro FL permite recoger los posibles precipitados formados durante el proceso. Las vesículas formadas se recogieron en el recipiente C, y después se almacenaron en frascos de vidrio a 4 °C. Tras completarse la despresurización, V-6 y V-2 se cerraron, y se llevó a cabo la despresurización del equipo volviendo a abrir V-6.

40

Ejemplo 3. Preparación de vesículas de DPPC:Colesterol:colesterol-PEG-RGD mediante tecnología de fluidos comprimidos

45

En primer lugar, una solución de 8 mg de Colesterol, 24 mg de DPPC y 4 mg de conjugado (colesterol-PEG-RGD) en 1,2 ml de etanol se introdujeron en un reactor de alta presión con un volumen de 7,5 ml, a presión atmosférica y temperatura de trabajo ($T_w = 35$ C). Se añadió CO_2 comprimido, llevando la expansión volumétrica de la solución hasta una relación molar $X_{CO_2} = 0,8$ y a una presión de trabajo de 10 MPa. Para conseguir la homogeneización total y el equilibrio térmico, el sistema se dejó durante aproximadamente 60 minutos a 10 MPa y 35 °C. Finalmente, la solución orgánica expandida se despresurizó a partir de la solución de trabajo hasta presión atmosférica, para 24 ml de una solución acuosa. En esta última etapa, una corriente de N_2 a 10 MPa se usó como émbolo para empujar la solución de colesterol en etanol para mantener constante la presión de trabajo en el reactor durante la despresurización. A continuación, las vesículas se transfirieron a un recipiente que, cuando se selló, se almacena a 5 ± 3 °C hasta el uso.

50

55

Como resultado, se obtuvieron vesículas de DPPC:Colesterol:colesterol-PEG-RGD (10:6:1) con aspecto microscópico, tamaño promedio y potencial Z mostrado en la [Tabla 1](#).

El tamaño promedio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial Z se determinaron mediante DLS (Dispersión dinámica de luz) a una temperatura de 25 grados centígrados.

La [Tabla 1](#) muestra los resultados de aspecto físico, tamaño promedio de partículas y potencial Z de diferentes lotes de vesículas DPPC:colesterol:colesterol-PEG-RGD.

5

Tabla 1:

Composición	Tamaño promedio ³ (nm) (±SD) ⁴	PDI ³ (±SD) ⁴	Potencial ³ (mV) (±SD) ⁴
DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter ¹ (1,3 mM:0,8 mM:0,1 mM)	152,7 (± 0,8)	0,182 (± 0,010)	+32,4 (± 2,4)
	128,8 (± 0,2)	0,235 (± 0,017)	+30,4 (± 1,4)
DPPC:Col:Col-PEG-RGDcarb ² (1,3 mM:0,8 mM:0,1 mM)	141,5 (± 1,8)	0,357 (± 0,005)	-9,5 (±0,2)
	117,9 (± 0,6)	0,357 (± 0,008)	-0,9 (±0,3)

¹Vesículas de DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-RGD con enlace éter,

²Vesículas de DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-RGD con enlace carbamato,

Las mediciones de DLS se llevaron a cabo con un instrumento Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

PDI: Índice de polidispersidad ⁴SD: Desviación estándar de tres mediciones consecutivas en el mismo lote de muestra.

10

15

20

Con respecto al aspecto macroscópico de diferentes formulaciones, se observó que tanto las vesículas preparadas usando Colesterol-PEG-RGD con enlace éter y las vesículas preparadas usando Colesterol-PEG-RGD con enlace carbamato tienen el aspecto de una solución opalescente dispersa. Por otra parte, se observó que en el caso de las vesículas de DPPC:Colesterol:Colesterol-PEG-RGD con enlace éter, las diferentes preparaciones de vesículas no tuvieron problemas de estabilidad a corto plazo, un tamaño promedio e índice de polidispersidad bajos, los que las convierte en atractivas desde el punto de vista farmacéutico. Dicho índice de polidispersidad es mayor en el caso de las vesículas Colesterol-PEG-RGD con enlace carbono, cuya distribución es bimodal, a diferencia de la monomodalidad encontrada para las vesículas que contienen Colesterol-PEG-RGD con enlace éter (Fig. 2). Para este último sistema, se descubrieron potenciales Z más altos (aproximadamente +30 mV), comprendidos dentro del intervalo de valores considerados que permiten la estabilidad de los sistemas dispersados con el tiempo. Se concluyó por tanto que, en términos tanto del tamaño de partícula como de la estabilidad de la suspensión, las vesículas que tienen conjugados con enlace éter tienen mejores propiedades que las vesículas que tienen conjugados con enlace carbamato.

Ejemplo 4. Experimentos de internalización.

25

Para evaluar si los liposomas que transportan los conjugados de la invención tienen propiedades superiores en términos de administración intracelular de su contenido, en comparación con los liposomas que transportan conjugados de la técnica anterior, se llevó a cabo un experimento de internalización del contenido de los liposomas en una línea celular. La sustancia administrada fue un colorante que se puede controlar con facilidad mediante fluorescencia.

30

Marcado de liposomas

35

Para el marcado de liposomas, 500 µl de liposomas puros (liposomas DPPC:Col) se mezclaron directamente con 25 µl de una solución etanólica DiD (1 µM) hasta una concentración final de 50 nm del colorante en la membrana. Después de 30 min de mezclado, el DiD libre se separó de la muestra total mediante filtración en gel. Con este fin, columnas preempaquetadas (PD SpinTrap G-25) se equilibraron tres veces con tampón PBS y a continuación se añadieron 130 µl de muestra. La separación se llevó a cabo mediante centrifugación a 800 x g.

El procedimiento anteriormente descrito se repitió análogamente para los otros tipos de liposomas.

40

Cultivo celular.

45

Las células CDC/EU.HMEC-1 (HMEC-1) fueron proporcionadas por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC-NIDR). HMEC-1 es una línea de células endoteliales microvasculares humanas inmortalizadas que retienen las características morfológicas, fenotípicas y funcionales de las células endoteliales microvasculares humanas. Las células HMEC-1 se mantuvieron en MCDB 131 (Invitrogen) suplementado con 50 unidades·ml⁻¹ de penicilina, 50 µg ml⁻¹ de estreptomina, L-glutamina 10 mM y suero de feto de ternera (FBS) al 10 %, en una atmósfera humidificada a 37°C con CO₂ al 5 %. Todos los medios, suero y antibióticos se adquirieron de Invitrogen.

50

La captación celular de los Liposomas se evaluó mediante microscopio láser de barrido confocal (LSCM).

Las células HMEC-1 se sembraron en placas de cultivo Fluorodish (World Precision Instruments, Sarasota, FL) a una densidad de 2x10⁵ células por placa y se dejaron crecer durante 36-48 horas. 50 µl de Liposomas marcados con DiD (DPPC:Col) o conjugados de Liposoma-RGD marcados con DiD (liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter y liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDcarbamato) (1,5 mg/ml) se mezclaron con 200 µl de medio MCDB 131, se añadieron a las

células y se incubaron durante 3 h a 37°C en una atmósfera humidificada a 37°C con CO₂ al 5 %. Posteriormente, las células se lavaron con MCDB 131 exento de suero y se incubaron a 37°C durante 5 min con Lyotracker Green DND-26 (50 nM, Molecular probes, Eugene, Oregón) para marcar los compartimentos endosómicos/lisosómicos. Las células se examinaron con un microscopio confocal invertido de barrido con láser Leica SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania), con un objetivo de inmersión a60x 1.42 NA. Para visualizar simultáneamente dos colores de fluorescencia, los inventores utilizaron una línea de láser de argón de Lyotracker verde y la línea de 630 nm de un láser He-Ne para DiD.

Las imágenes confocales de los liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter (parte superior), liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDcarbamato (centro) y liposomas DPPC:Col (parte inferior) se muestran en la Fig. 3. Las manchas observadas en el canal rojo (columna de la derecha) muestran la presencia de liposomas marcados internalizados en las células. Se observa claramente que para los liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter, esta internalización es mayor en comparación con las otras dos.

Citometría de flujo.

Las células HMEC-1 se sembraron con densidades de 2x10⁵ células ml⁻¹ en placas de cultivo Fluorodish (World Precision Instruments, Sarasota, FL) 36-48 h antes del experimento. Las células se incubaron con Liposomas marcados con DiD (DPPC:Col) o conjugados de Liposoma-RGD marcados con DiD (liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter y liposomas DPPC:Col:Col-PEG-RGD-carbamato) (0,3 mg/ml) resuspendidos en MCDB 131 suplementado con L-glutamina 10 mM sin FBS durante 3 horas a 37°C. A continuación, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), se separaron usando tripsina, y se volvieron a suspender en medio de cultivo celular antes de someterlas a un análisis de clasificación celular activada por fluorescencia. La adquisición y el análisis de datos se llevó a cabo usando un barrido FACS (Beckton-Dickinson) y el programa informático BD FACSDiva. 10.000 células viables se evaluaron en cada experimento.

En la Fig. 4 puede observarse la intensidad de fluorescencia asociada con las células que han internalizado los liposomas marcados con DiD. Se muestra que dicha internalización es significativamente mayor cuando se utilizan liposomas que tienen DPPC:Col:Col-PEG-RGDéter que cuando se usan liposomas que tienen DPPC:Col:Col-PEG-RGDcarbamato liposomas simples DPPC:Col que no tienen conjugados.

Ejemplo 5. Experimentos de actividad *in vitro*.

Ensayos de actividad:

Cultivos primarios de células endoteliales aórticas de ratón (MAEC) de ratones deficientes en GLA (alfa galactosidasa) (GlatmKuH) se aislaron según procedimientos descritos anteriormente (Shu L., et al. "An *in vitro* model of Fabry disease" J. Am. Soc. Nephrol. 2005, vol. 16, págs. 2636-45). El origen endotelial de las células aisladas se confirmó por tinción con CD105.

Para los ensayos de actividad, las células en los pasos 2 a 5 se sembraron en placas de 24 pocillos que se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 5 %. Veinticuatro horas después de la siembra, se añadió NBD-Gb3 8 µM de (Matreya) a los cultivos, junto con las concentraciones especificadas de los compuestos estudiados (exentos de enzima - alfa galactosidasa, liposomas que contienen enzima o liposomas vacíos). Después de 48 h de incubación, las células se tripsinizaron, y la señal fluorescente de Gb3-NBD se analizó mediante citometría de flujo (FacsCalibur, Beckton Dickinson). Para calcular el porcentaje de la señal de Gb3-NBD, la señal fluorescente de las células del control (sin tratamiento) se estableció como el 100%, y el resto de los valores se normalizaron en consecuencia. Puesto que la actividad alfa-galactosidasa reduce estos depósitos de Gb3, el porcentaje de pérdida de Gb3 (% de pérdidas de Gb3 = 100 - % Gb3-síñal NBD) se usó para representar gráficamente los resultados.

Se puede observar en la Fig. 5 que la actividad alfa galactosidasa de los liposomas en los cultivos de MAEC procedentes de ratones deficientes en alfa galactosidasa. 1,5 µg/ml de enzima libre (alfa-galactosidasa - histograma de barras número 1 en la Fig. 5) redujo los depósitos de Gb3 en un 92,32%. Los liposomas que incorporaron la misma enzima redujeron los depósitos de Gb3 de una forma similar (88,9 %) independientemente de tener un enlace carbamato o éter (histograma de barras número 2 en la Fig. 5). La purificación de los liposomas mediante diafiltración redujo ligeramente esta actividad (histograma de barras número 3 en la Fig. 5), sin embargo, hay que resaltar que la concentración de la enzima en estos liposomas purificados será menor de 1,5 µg/ml, que representa solo una fracción (habitualmente de aproximadamente el 80 %) de la enzima total utilizada en la preparación del liposoma que queda encapsulada.

También se muestra en la Fig. 6 que los liposomas diafiltrados que tienen los conjugados con el enlace éter tienen una mayor actividad que los que tienen los conjugados con enlace carbamato a concentraciones variables.

Ejemplo 6. Mejora de la actividad enzimática específica debida a la encapsulación de alfa-galactosidasa en liposomas que tienen los conjugados de la invención (con un enlace éter).

Producción de GLA (alfa-galactosidasa) recombinante

El vector de expresión pOpinE-GLA codifica una versión de longitud completa del gen de la α -galactosidasa (GLA) humana, clonado en el plásmido pOPINE p(Berrow NS, et al. "A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications" *Nucleic Acids Res* 2007, vol. 35, e45). La línea de células HEK (riñón embrionario humano) adaptada para suspensión Freestyle™ 293 F (Gibco, Invitrogen corporation) se usó para producir GLA recombinante mediante la expresión transitoria del gen mediada por PEI. Los detalles de la producción y purificación de GLA se han descrito anteriormente (Corchero JL, et al., "Integrated approach to produce a recombinant, his tagged human alpha-galactosidase a in mammalian cells", *Biotechnol Prog.* 2011, vol. 27, págs. 1206-1217).

Detección y cuantificación de GLA recombinante encapsulada en liposomas

Para estimar la incorporación de GLA recombinante en liposomas, muestra de 1) GLA inicial en agua, 2) GLA mezclada con lípidos, 3) liposomas purificados y 4) agua que contiene GLA libre no encapsulada, se mezclaron con tampón de carga desnaturizante y se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior transferencia Western revelada con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra suero de GLA de Santa Cruz Biotechnology (a-gal A H-104: sc-25823) y un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugado con HRP (Bio-Rad Laboratories, Inc., n.º cat. 170-6515) como anticuerpo secundario. Las cantidades de GLA recombinante en cada una de las muestras anteriormente mencionadas se estimaron por comparación con cantidades conocidas (habitualmente comprendidas de 25 a 125 ng) de una GLA recombinante anteriormente producida, purificada, y cuantificada en el laboratorio de los inventores. Las muestras a comparar cuantitativamente se analizaron con el mismo gel y se procesaron conjuntamente. Los análisis de densitometría de las bandas se realizaron con el programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Inc). El porcentaje de GLA encapsulada se obtuvo por comparación con las cantidades de GLA que se encuentran en las fracciones de liposomas purificadas respecto de la cantidad inicial total de GLA añadida.

Caracterización de GLA recombinante encapsulada en liposomas

La actividad enzimática de la α -galactosidasa de la GLA encontrada en las diferentes muestras se sometió a ensayo, in vitro, fluorométricamente como se describe en Desnick et al. (Desnick RJ, et al. "Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotas and heterozygotas. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes", *J. Lab. Clin. Med.* 1973, vol. 81, pp. 157-171) con las modificaciones de Mayes et al. (Mayes JS., et al. "Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease" *Clin. Chim. Acta* 1981, vol. 112, págs. 247-251). En resumen, la actividad enzimática se sometió a ensayo usando como sustrato α D-galactósido de 4 metilumbeliferilo (4MUG, Sigma Chemical), a una concentración de 2,46 mM en tampón de ensayo (ácido acético 0,01 M, pH 4,5). Una mezcla de reacción de ensayo típica contiene 100 μ l de sustrato y 25 μ l de muestra de enzima. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en agitación, a 37°C durante 1 hora, y se detuvieron con 1,25 ml de tampón glicina-NaOH 0,2 M (pH 10,4). El producto liberado (4-metilumbeliferona o 4-MU) se determinó por mediciones de fluorescencia a 365 y 450 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. Las muestras que contenían de 0 a 500 ng de 4-MU/ml de 4-MU comercial (Sigma Chemical) en tampón glicina-NaOH 0,2 M (pH 10,4) se usaron para calibrar las lecturas. Las actividades enzimáticas específicas se expresaron como μ mol de 4-MU/h/mg de proteína.

Estabilidad de GLA recombinante en liposomas.

La estabilidad de GLA en las diferentes muestras se analizó según su actividad enzimática específica. Después de su preparación ("Día cero"), la cantidad de proteína GLA y la actividad enzimática se determinaron (como se describe anteriormente) para cada muestra. Con estos valores, se determinó la actividad enzimática específica inicial. Las muestras se mantuvieron en agua a 4°C, y para diferentes puntos temporales, se analizó la actividad enzimática. Usando cantidades iniciales de GLA, las actividades enzimáticas específicas se recalcularon y se compararon con la determinada en el "Día cero", usado como referencia.

Eficacia de la encapsulación de GLA en los liposomas.

Para cada experimento de encapsulación, las siguientes muestras se obtuvieron y se analizaron:

1. GLA inicial (antes de la encapsulación).
2. GLA total, es decir, el resultado de añadir los lípidos al punto 1 y encapsular una fracción de la GLA inicial. Total significa GLA tanto encapsulada como no encapsulada. La separación entre los liposomas que encapsulan GLA y la GLA libre que permanece en solución proporciona los puntos 3 y 4.
3. GLA encapsulado en liposomas, es decir, solamente la GLA que ha quedado encapsulada.
4. GLA libre, es decir, GLA que no ha quedado encapsulada.

ES 2 696 623 T3

La eficacia de la encapsulación de GLA en las vesículas, tal como se determina mediante SDS-PAGE y adicional transferencia Western en diferentes experimentos, se muestra en la siguiente tabla:

n.º Experimento	Muestra	µg GLA/ml	Eficacia de la encapsulación de GLA
A	"Total" (2)	3,87	
	SUVs-GLA (3)	0,63	16%
	GLA libre (4)	3,67	95%
B	"Total" (2)	4,17	
	SUVs-GLA (3)	1,23	29%
	GLA libre (4)	2,53	61%
C	"Total" (2)	4,31	
	SUVs-GLA (3)	0,97	23%
	GLA libre (4)	3,88	90%
D	"Total" (2)	7,90	
	SUVs-GLA (3)	2,32	29%
	GLA libre (4)	5,30	67%
E	"Total" (2)	7,70	
	SUVs-GLA (3)	2,27	29%
	GLA libre (4)	3,90	51%
F	"Total" (2)	6,40	
	SUVs-GLA (3)	2,28	36%
	GLA libre (4)	3,40	53%

5 De acuerdo con estos resultados, la eficacia de la encapsulación de GLA en las vesículas es de 27 +/- 6,8 % (media +/- desviación estándar).

n.º Experimento	Muestra	Actividad enzimática específica µmol 4MU/h/mg GLA
A	GLA inicial (1)	312
	Total (2)	1349
	SUVs-GLA (3)	1570
B	GLA inicial (1)	362
	Total (2)	1112
	SUVs-GLA (3)	957
C	GLA inicial (1)	221
	Total (2)	1239
	SUVs-GLA (3)	1716
D	GLA inicial (1)	109
	Total (2)	1542
	SUVs-GLA (3)	1750
E	GLA inicial (1)	81
	Total (2)	1454
	SUVs-GLA (3)	1780
F	GLA inicial (1)	109
	Total (2)	2001
	SUVs-GLA (3)	1934

10 La adición de la solución de GLA a los lípidos que formarán las vesículas da como resultado un aumento significativo en la actividad enzimática específica de la enzima encapsulada.

Como se puede observar, la actividad enzimática específica de las muestras "Totales" (GLA mezclada con los lípidos que forman las vesículas) aumenta claramente (de 4 a 18 veces) cuando se compara con la GLA inicial, aunque no asociada con las vesículas o sus componentes.

5

Referencias citada en la solicitud

Torchilin V. "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers". *Nature Rev. Drug Disc.* 2005, vol. 4, pp. 145-160.

10

Dubey P., et. al. "Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting". *J. Drug Targ.* 2004, vol. 12, pp. 257-264.

15

Negishi Y., et. al. "Preparation and characterization of laminin-derived peptide AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool". *Biol. Pharm. Bull.* 2010, vol. 33, pp. 1766-1769.

Pan X., et. al. "Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR". *Bioconjugate Chem.* 2007, vol. 18, pp. 101-108.

20

Thomson B., et. al. "Neutral post grafted colloidal particles for gene delivery". *Bioconj. Chem.* 2005, vol. 16, pp. 608-614.

Boomer J., et. al. "Cytoplasmic delivery of liposomal contents mediated by an acid-labile cholesterol-vinyl ether-PEG conjugate" *Bioconj. Chem.* 2009, vol. 20, 47-69.

25

Dai X, et. al. "An improved synthesis of a selective $\alpha\beta 3$ -integrin antagonist cyclo (-RGDfK)" *Tetrahedron Letters* 2000, vol. 41, pp. 6295-6298.

Berrow NS, et al. "A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications" *Nucleic Acids Res* 2007, vol. 35, e45

30

Corchero JL, et al., "Integrated approach to produce a recombinant, his tagged human alpha-galactosidase a in mammalian cells", *Biotechnol Prog.* 2011, vol. 27, págs. 1206-1217

35

Desnick RJ, et al. "Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotas and heterozygotas. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes", *J. Lab. Clin. Med.* 1973, vol. 81, págs. 157-171

Mayes JS., et al. "Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease" *Clin. Chim. Acta* 1981, vol. 112, págs. 247-251

40

Cano-Sarabia, M. et. al. "Preparation of Uniform Rich Cholesterol Unilamellar Nanovesicles Using CO₂-Expanded Solvents". *Langmuir* 2008, vol. 24, págs. 2433-2437

Shu L., et al. "An in vitro model of Fabry disease" *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, vol. 16, págs. 2636-45

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) FUNDACIO HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA FUNDACIO PRIVADA INSTITUT DE RECERCA BIOMEDICA UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN RED EN BIOINGENIERIA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA (CIBER-BBN) FUNDACIO PRIVADA PARC CIENTIFIC DE BARCELONA UNIVERSITAT DE BARCELONA

50

<120> CHOL-PEG-RGD

55

<160> 1

<170> BiSSAP 1.0

60

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

65

ES 2 696 623 T3

<213> Secuencia artificial
<220>

5

<221 > SOURCE

<222> 1..5

10

<223> /mol_type="proteína" /nota='RGD K son L-aminoácidos, F es D-aminoácido' /organismo="Secuencia artificial"

<400> 1

Arg Gly Asp Phe Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, que comprende:
 - 5 i) un esteroles;
 - ii) una cadena de polietilenglicol que tiene un extremo proximal y un extremo distal, en el que dicha cadena de polietilenglicol está unida covalentemente por su extremo proximal a i) mediante un enlace de tipo alquil éter;
 - iii) un péptido, capaz de unirse selectivamente a uno o varios receptores presentes en una célula diana, estando dicho péptido unido covalentemente al extremo distal de ii).
- 10 2. Conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el esteroles es colesterol.
3. Conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la cadena de polietilenglicol tiene un número de repeticiones de 2 a 10.
- 15 4. Conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido comprende una secuencia RGD.
5. Conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el péptido es un péptido con la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 20 6. Un liposoma que comprende un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Liposoma de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene una distribución de tamaño de partículas monomodal.
- 25 8. Liposoma de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el tamaño de partícula promedio es de 25 hasta 500 nanómetros, y el potencial Z promedio en valor absoluto es de 20 hasta 90 mV.
9. Liposoma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un agente terapéutico.
- 30 10. Liposoma de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el agente terapéutico es α -galactosidasa.
11. Liposoma como se define en la reivindicación 6, para su uso en un sistema de administración de agentes terapéuticos.
- 35 12. Liposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, para su uso como medicamento.
13. Liposoma como se define en la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Fabry.
- 40 14. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los liposomas que se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, junto con excipientes y/o transportadores farmacéuticamente aceptables.
- 45 15. Método para preparar el conjugado que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:
 - a) hacer reaccionar un esteroles con haluro de sulfonilo en presencia de una base y un disolvente para proporcionar el correspondiente éster de sulfonilo;
 - 50 b) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa a) con un polietilenglicol con un número de repeticiones de 2 a 10 en presencia de un disolvente;
 - c) activar el compuesto obtenido en la etapa b) con carbonato de disuccinimidilo;
 - d) hacer reaccionar el compuesto resultante de la etapa c) con un péptido que comprende la secuencia RGD en presencia de una base y un disolvente.
- 55 16. Método para preparar el liposoma que se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 y 12, que comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparar una solución acuosa que puede incluir opcionalmente un tensioactivo;
 - 60 b) Preparar una solución que comprende el conjugado que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, colesterol y, opcionalmente, un fosfolípido disuelto en un disolvente orgánico, donde la solución orgánica se expande con un fluido comprimido;
 - c) Opcionalmente, añadir un agente terapéutico bien a la solución de la etapa a), o a la solución de la etapa b) antes de expandir la solución; y
 - 65 d) Despresurizar la solución resultante de la etapa b) sobre la solución resultante de la etapa a).

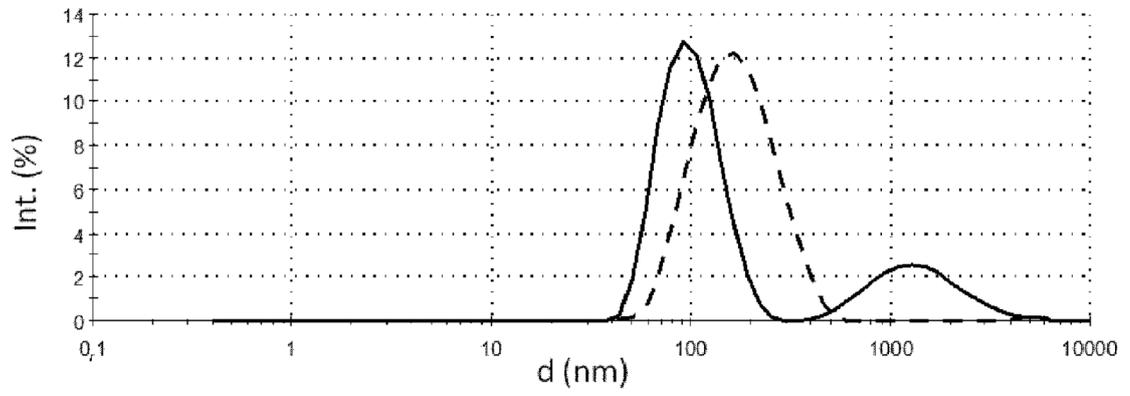


FIG. 2

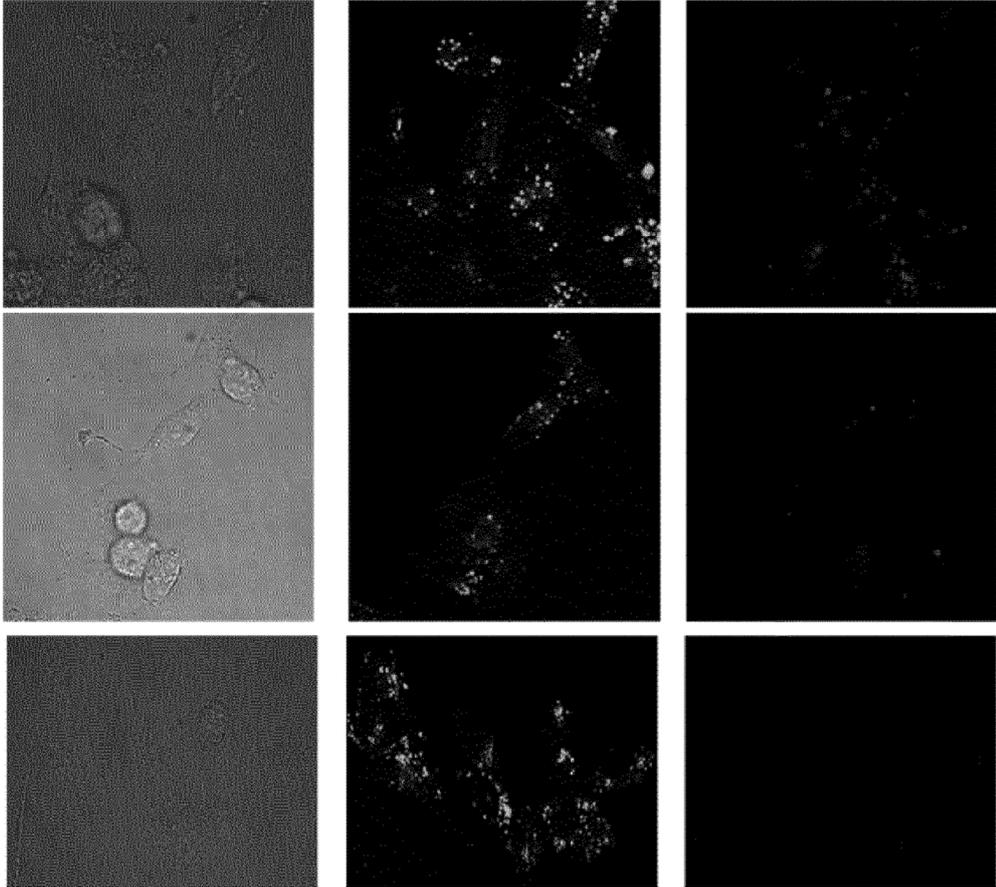


FIG. 3

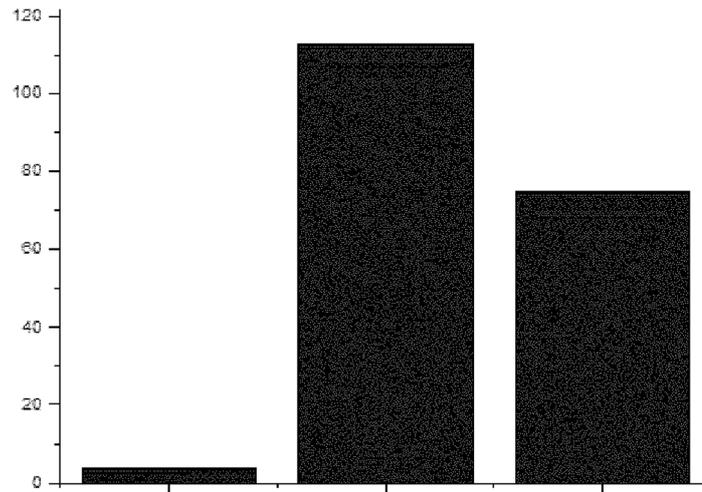


FIG. 4

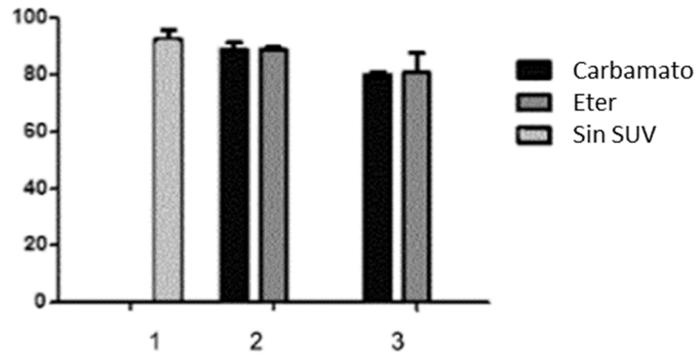


FIG. 5

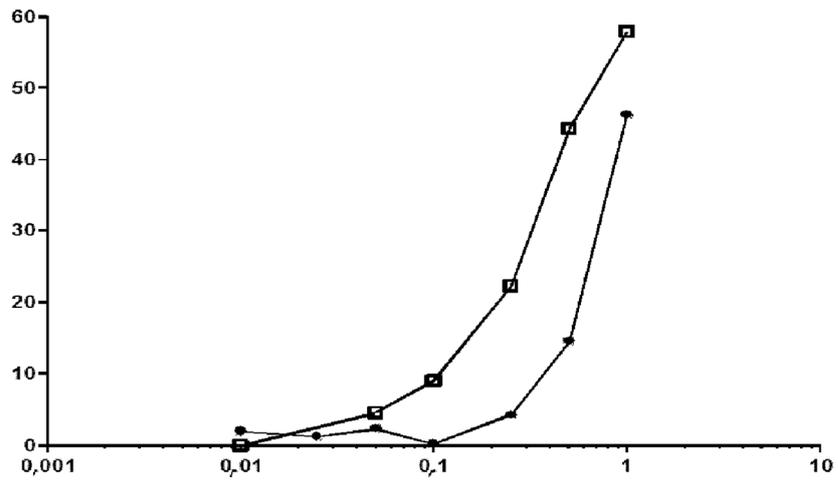


FIG. 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **TORCHILIN V.** Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev. Drug Disc.*, 2005, vol. 4, 145-160 [0003] [0090]
- **DUBEY P.** Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting. *J. Drug Targ.*, 2004, vol. 12, 257-264 [0004] [0090]
- **NEGISHI Y.** Preparation and characterization of laminin- derived peptide AG73-coated liposomes as a selective gene delivery tool. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, vol. 33, 1766-1769 [0004] [0090]
- **PAN X.** Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR. *Bioconjugate Chem.*, 2007, vol. 18, 101-108 [0005] [0090]
- **THOMSON B.** Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery. *Bioconj. Chem.*, 2005, vol. 16, 608-614 [0005]
- **BOOMER J.** Cytoplasmic delivery of liposomal contents mediated by an acid-labile cholesterol-vinyl ether-PEG conjugate. *Bioconj. Chem.*, 2009, vol. 20, 47-69 [0007] [0090]
- **DAI X.** An improved synthesis of a selective α 3-integrin antagonist cyclo (-RGDfK). *Tetrahedron Letters*, 2000, vol. 41, 6295-6298 [0049]
- **CANO-SARABIA, M.** Preparation of Uniform Rich Cholesterol Unilamellar Nanovesicles Using CO₂-Expanded Solvents. *Langmuir*, 2008, vol. 24, 2433-2437 [0060] [0090]
- **SHU L. et al.** An in vitro model of Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, vol. 16, 2636-45 [0075] [0090]
- **BERROW NS et al.** A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res*, 2007, vol. 35, e45 [0079] [0090]
- **CORCHERO JL et al.** Integrated approach to produce a recombinant, histagged human alpha-galactosidase a in mammalian cells. *Biotechnol Prog.*, 2011, vol. 27, 1206-1217 [0079] [0090]
- **DESニック RJ et al.** Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotas and heterozygotas. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973, vol. 81, 157-171 [0081] [0090]
- **MAYES JS. et al.** Differential assay for lysosomal alpha-galactosidasas in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin. Chim. Acta*, 1981, vol. 112, 247-251 [0081] [0090]
- **THOMSON.** Neutral postgrafted colloidal particles for gene delivery. *Bioconj. Chem.*, 2005, vol. 16, 608-614 [0090]
- **DAI X.** An improved synthesis of a selective α 3-integrin antagonist cyclo (-RGDfK). *Tetrahedron Letters*, 2000, vol. 41, 6295-6298 [0090]