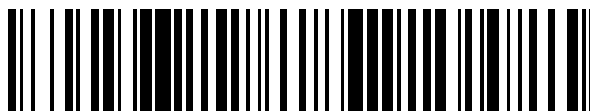


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 098**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2015 PCT/EP2015/059933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2015 E 15723866 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3139964**

54 Título: **Sistema portador magnetoenzimático para imagenología y transporte y liberación selectivos de agentes activos**

30 Prioridad:

06.05.2014 EP 14167196

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

27.11.2019

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**GLÜET, CLAUS-CHRISTIAN;
PENATE MEDINA, TUULA y
PENATE MEDINA, OULA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 098 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

Sistema portador magnetoenzimático para imagenología y transporte y liberación selectivos de agentes activos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un sistema portador magnetoenzimático en forma de una composición liposomal para la imagenología y el transporte y liberación selectivos de agentes activos como se define en las reivindicaciones. La degradación enzimática de los fosfolípidos conduce a la liberación de los agentes activos transportados. La velocidad de liberación puede amplificarse y modularse aplicando un campo magnético alterno (AMF). Además, la velocidad de liberación se puede monitorear mediante imagenología, y regularla según se desee. La presente invención se refiere además al uso del sistema portador magnetoenzimático en la terapia y / o el diagnóstico, en particular al uso en la terapia o el diagnóstico de enfermedades tipificadas por apoptosis local y necrosis, como el 10 cáncer, y de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide.

Antecedentes de la invención

15 Los liposomas y las micelas se encuentran entre las nanoestructuras más comunes utilizadas en las aplicaciones clínicas de administración de fármacos. Al mejorar preferentemente la localización de la actividad farmacéutica en el órgano o tejido de interés, su uso tiene la capacidad de reducir las dosis sistémicas requeridas de fármacos, minimizando así el riesgo de efectos secundarios adversos a la vez que aumenta la eficacia del tratamiento. Los liposomas se han generado en múltiples entornos y en diferentes formulaciones para uso clínico, y generalmente se toleran bien. En general, los liposomas se utilizan para solubilizar fármacos y prolongar su semivida en la sangre. Los liposomas también tienden a acumularse en los tejidos tumorales debido al efecto mejorado de la permeación y retención (EPR). Una vez que los liposomas se han acumulado en el sitio objetivo, por ejemplo, el sitio tumoral, los 20 agentes activos transportados por los liposomas deben liberarse, preferiblemente de manera eficaz y controlable, para obtener los efectos de tratamiento deseados.

25 Los liposomas termosensibles diseñados para liberar fármacos localmente en respuesta a la hipertermia son conocidos por su uso en el transporte de fármacos específico de sitio. Cerca de su temperatura de transición de fase de gel a cristalina líquida, tales liposomas termosensibles liberan sus agentes activos encapsulados más rápidamente y, por lo tanto, pueden lograr la liberación selectiva de fármacos. La liberación de fármacos de los liposomas termosensibles por hipertermia a través de la acción de un campo magnético alterno (AMF) sobre las partículas paramagnéticas se describe, por ejemplo, en el documento US 2009/0004258. Además, la liberación de fármacos de liposomas termosensibles que usan partículas superparamagnéticas incrustadas en la membrana del liposoma se conoce del documento WO 2011/147926, y la liberación de fármacos de liposomas utilizando una entidad paramagnética se describe en el documento WO 2012/104275. 30

35 El inconveniente de los liposomas termosensibles es que son muy frágiles al manejarlos. En particular, los liposomas termosensibles sufren un alto grado de escape de contenido en la sangre, de entre aproximadamente el 5% y el 20% por hora, lo que los hace vehículos deficientes para el transporte de fármacos. Además, todos los liposomas termosensibles utilizados clínicamente tienen una semivida en la sangre de menos de 30 minutos. Otro problema es que el calentamiento del tejido objetivo requerido para la liberación del fármaco también daña el tejido circundante. Aunque se dirigieron grandes esfuerzos a limitar los daños en los tejidos inducidos por el calor, todavía no es posible eliminar completamente el riesgo de daños en los tejidos.

40 Otra posible estrategia para el transporte selectivo de fármacos se basa en la liberación mediada por esfingomielinasa (SMasa) de fármacos transportados por liposomas. La SMasa es una de las enzimas clave involucradas en las vías de respuesta al estrés celular. La actividad elevada de la SMasa se asocia a menudo con tumores, inflamación y necrosis, o se puede inducir por factores de estrés celular como la luz UV, el calor, el estrés oxidativo, la radiación ionizante y los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina, gemcitabina y etopósido). La SMasa convierte la esfingomielina (SM) de los liposomas que contienen SM (liposomas SM) en ceramida, y se ha descubierto 45 que rompe la membrana del liposoma y permite el escape del contenido de los liposomas en un sistema de modelo animal (Oula Penate Medina, 2013).

50 Sin embargo, en el tratamiento de pacientes humanos, la inducción de SMasa en el sitio de tratamiento en un nivel suficiente para efectuar la liberación de los agentes activos no está exenta de problemas. Por ejemplo, si se usa radiación para inducir la actividad de la SMasa, se debe usar una dosis de radiación indeseablemente alta para lograr una liberación satisfactoria del contenido de los liposomas SM.

55 Por lo tanto, los vehículos farmacológicos existentes para el transporte de fármacos específico de sitio no son totalmente satisfactorios, y todavía hay posibilidad de mejorar. En particular, aunque actualmente es posible obtener imágenes de varios estados patológicos, como la inflamación o el cáncer, solo ha habido un éxito limitado para dirigir eficientemente los tratamientos específicamente al sitio del que se han obtenido imágenes. Además, todavía es imposible o difícil controlar o ajustar específicamente el grado de liberación de fármaco en el sitio de la enfermedad.

Objetivo de la invención

En vista de lo anterior, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios y métodos para el transporte y la liberación selectiva de un agente activo de una manera eficaz y controlable.

Sumario de la invención

5 El objetivo anterior se resuelve mediante una composición que comprende liposomas (también denominada en la presente memoria "composición liposomal"), como se define en las reivindicaciones, en la que los liposomas comprenden:

10 (a) fosfolípidos, que pueden ser del mismo tipo de fosfolípidos simples o una mezcla de diferentes fosfolípidos (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 diferentes), y que generalmente forman la bicapa lipídica (o "membrana liposomal" del liposoma), en donde los fosfolípidos comprenden esfingomielina (SM) (en cuyo caso los liposomas pueden denominarse en la presente memoria "liposomas de esfingomielina (SM)") y en los que el contenido de esfingomielina de los liposomas está en el intervalo del 10 %mol al 45 %mol.

15 (b) nanopartículas magnéticas, preferiblemente nanopartículas magnéticas que comprenden un metal, aleación de metales, óxido de metal, hidróxido de metal, óxido de metal mixto, hidróxido de metal mixto, nitruro de metal, sulfuro de metal, nitruro de metal mixto o sulfuro de metal mixto, en donde el metal se selecciona del grupo que consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto y níquel, especialmente del grupo que consiste en hierro, cobalto o níquel, más preferiblemente nanopartículas magnéticas que comprenden hierro, y lo más preferiblemente nanopartículas magnéticas que comprenden óxido de hierro (particularmente Fe_3O_4) o un óxido mixto de hierro y al menos un metal adicional;

20 y donde los liposomas comprenden además uno o ambos componentes (c) y (d):

25 (c) un agente de imagenología y / o una etiqueta de imagenología, en donde el agente de imagenología y la etiqueta de imagenología son iguales o, preferiblemente, diferentes, y preferiblemente se seleccionan independientemente del grupo que consiste en isótopos radiactivos, agentes de contraste (por ejemplo, agentes de contraste de resonancia magnética tales como complejos de gadolinio, agentes de contraste de imagenología de partículas magnéticas, agentes de contraste de ultrasonidos, agentes de contraste fotoacústicos, agentes de contraste de rayos X como los compuestos que contienen metales pesados o yodo), fluoróforos (por ejemplo, un quelato de gadolinio como el verde de indocianina (ICG)) y etiquetas de PET (tomografía por emisión de positrones),

30 (d) al menos un agente activo, en donde al menos un agente activo es preferiblemente un agente terapéutico y / o un agente nutricional (por ejemplo, un antioxidante), particularmente preferible un agente citostático; y

en donde los liposomas comprenden opcionalmente

(e) compuestos adicionales, incluidas moléculas selectivas unidas a la membrana liposomal.

35 En una realización preferida de la presente invención, los liposomas comprenden los componentes (a), (b) y un agente de imagenología pero ninguna etiqueta de imagenología y ningún agente(s) activo(s). En otra realización preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b), y una etiqueta de imagenología, pero ningún agente de imagenología y ningún agente(s) activo(s). En otra realización preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b), un agente de imagenología y una etiqueta de imagenología, pero ningún agente(s) activo(s). En otra realización preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b), (d) y un agente de imagenología, pero ninguna etiqueta de imagenología. En otra realización preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b), (d) y una etiqueta de imagenología, pero ningún agente de imagenología. En otra realización preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b) y (d), pero ningún agente de imagenología y ninguna etiqueta de imagenología. En una realización particularmente preferida, los liposomas comprenden los componentes (a), (b), (d), y una etiqueta de imagenología y un agente de imagenología.

Los liposomas usados en la presente invención son capaces de liberar el agente de imagenología, si está presente (y está comprendido en los liposomas en una forma liberable), y el al menos un agente activo, si está presente, en un medio objetivo por la acción concomitante de una fosfolipasa, que es capaz de degradar al menos un tipo de fosfolípido de dichos fosfolípidos, y un campo magnético alterno (AMF).

50 Como se usa en la presente memoria, el término "agente de imagenología" se refiere a una molécula que puede detectarse usando técnicas de imagenología y que cambia sus características de señalización al liberar el contenido del liposoma en el sitio objetivo (también denominado agente de imagenología "activo"). Así, el agente de imagenología actúa como indicador de la liberación del contenido liposomal. Preferiblemente, el agente de imagenología está ubicado en el interior (es decir, la luz) del liposoma pero, sin embargo, también puede estar incrustado en la membrana o, de manera menos preferida, unido al exterior de la membrana liposomal. Una "etiqueta de imagenología", dentro

del significado de la presente invención, se refiere a una molécula que puede detectarse usando técnicas de imagenología y que sirve para monitorear el transporte y la localización de liposomas (también conocida como etiqueta de imagenología "pasiva"). En otras palabras, un liposoma con una etiqueta de imagenología puede visualizarse *in situ* o *in vivo*. La etiqueta de imagenología también puede actuar como señal de referencia respecto de la cual se compara la intensidad de la señal del agente de imagenología después de la liberación. Preferiblemente, la etiqueta de imagenología está unida (por ejemplo, unida covalentemente a) el exterior de la membrana del liposoma. Sin embargo, también puede estar incrustada en la membrana del liposoma.

En el contexto de la presente invención, el término "agentes de diagnóstico" significa el agente de imagenología, la etiqueta de imagenología o una combinación de los mismos. También se contempla dentro del alcance de la presente invención que el agente de imagenología pueda actuar adicionalmente como una etiqueta de imagenología y viceversa. En este caso, solo se puede utilizar una molécula tanto para el agente de imagenología como para la etiqueta de imagenología (es decir, el agente de imagenología y la etiqueta de imagenología son los mismos compuestos químicos).

La composición liposomal de la presente invención permite el transporte y la liberación selectivos de uno o más agentes activos a un tejido objetivo y la liberación eficiente y específica del agente activo en el sitio objetivo, o en un medio objetivo, por la acción concomitante de un campo magnético alterno (AMF) y una fosfolipasa, que es capaz de degradar al menos un tipo de fosfolípido del liposoma.

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la liberación local del agente activo inducida por la degradación enzimática de los liposomas SM puede incrementarse sinérgicamente mediante la acción de un campo magnético alterno (AMF) sobre la nanopartícula magnética incorporada en un liposoma SM. Este efecto sinérgico hace que el efecto fisiopatológico local de la enzima (SMasa) sea lo suficientemente fuerte como para desencadenar la liberación de fármacos activos y / o agentes de imagenología (activos). Como resultado, la liberación es significativamente más fuerte que la lograda mediante SMasa sola. En particular, la liberación deseada se puede lograr con la concentración de enzima SMasa natural y que se encuentra normalmente en una enfermedad concreta. De hecho, la liberación es más fuerte que la liberación basada en SMasa sola en situaciones enriquecidas en concentración de SMasa, como después de una irradiación intensa. Además, se descubrió que el efecto de AMF se autolimita en el sentido de que el calentamiento de las nanopartículas magnéticas se limita a los portadores intactos, con un calentamiento insignificante una vez que se degrada la membrana. Además, la magnitud de la intensidad del AMF requerida es más adecuada (es decir, más baja) para su uso en el ámbito clínico que la propuesta en las aproximaciones de la técnica anterior.

Una AMF adecuada para su uso en la presente memoria se caracteriza por una densidad de flujo magnético de aproximadamente 60 mT o menos, en particular 40 o 20 mT o menos, preferiblemente 10 mT o menos, más preferiblemente 5 mT o menos y lo más preferiblemente 3 mT o menos. El límite inferior del AMF puede ser de 0,1 mT, 0,3 mT, 0,5 mT o 1,0 mT. Un rango preferido es de aproximadamente 0,5 mT a 10 mT, en particular de 1 mT a 7 mT, especialmente de 2 mT a 5 mT. Además, la frecuencia de modulación del campo puede estar en el rango de 50 kHz a 2000 kHz, típicamente en el rango de 75 kHz a 1200 kHz, en particular en el rango de 100 kHz a 1000 kHz. Se enfatiza que los valores indicados corresponden a un nivel de AMF de bajo a muy bajo, que es mucho más bajo que el utilizado convencionalmente en la técnica.

El sistema portador magnetoenzimático de la presente invención permite la regulación específica de sitio de la liberación del agente activo liposomal en el sitio objetivo (por ejemplo, un tumor o una infección). Esta estrategia abre aún más la posibilidad de usar fármacos contra el cáncer, que ya tienen la capacidad de activar la SMasa celular, lo que lleva a un bucle de activación. Además, los liposomas utilizados en el sistema portador magnetoenzimático de la presente invención inicialmente no son termosensibles, lo que evita un grado problemático de escape del contenido de los liposomas termosensibles. Además, el grado de escape del contenido de los liposomas no solo se puede alterar en función del tiempo, el espacio y la concentración de enzimas (es decir, la actividad de la enfermedad, reflejada en el estrés celular, lo que da como resultado que la SMasa sensibilice los liposomas o induzca la activación por SMasa) mediante el ajuste de la intensidad del AMF, sino que este proceso se puede monitorear (por ejemplo, mediante señales fluorescentes que cambian con la liberación del agente de imagenología (activo)) y, por lo tanto, se puede controlar mediante métodos de imagenología. De esta manera, el tratamiento se puede optimizar con respecto a la ubicación y la intensidad mediante el uso de campos AMF locales monitoreados mediante métodos de imagenología.

Además, el sistema de portador magnetoenzimático descrito en la presente memoria puede tener componentes de imagenología que ayudan a localizar el portador y proporcionan información sobre el estado del portador. Los campos magnéticos pueden aplicarse en el sitio del sistema portador acumulado, y darán como resultado la apertura de los liposomas si hay una cantidad suficiente de SMasa en el sitio. Esto no afecta a los portadores no activados, es decir, los portadores distintos de los que están cerca del área de la enfermedad no tendrán escapes de contenido y el tejido que rodea el sistema del portador no se calentará directamente.

Además, debido al hecho de que es posible detectar la tasa de liberación al monitorear los cambios en las intensidades de la sonda fluorescente y los desplazamientos espectrales simultáneamente, se puede recopilar información sobre la ubicación y la gravedad de la inflamación o estado de apoptosis y estrés del tejido canceroso. Esta información puede devolverse al sistema de AMF, que se puede aumentar o disminuir para adaptar la tasa de liberación al nivel

que se considere óptimo. El nivel de control ofrecido por la presente invención a través del monitoreo de los estímulos de liberación producidos de manera endógena no es posible con los sistemas actuales de transporte de fármacos.

De acuerdo con la presente invención, la fosfolipasa es preferiblemente una fosfatasa que hidroliza esfingomielina a ceramida, en particular esfingomielinasa (SMasa), más preferiblemente SMasa ácida (aSMasa) o SMasa neutra, y más preferiblemente aSMasa, y el fosfolípido degradado por SMasa es esfingomielina (SM). La SMasa hidroliza SM a ceramida, que se cree que se acumula en la superficie de la membrana liposomal, desestabilizando así los liposomas y aumentando su grado de escape del contenido. El AMF da como resultado un aumento de la temperatura mediado por las nanopartículas magnéticas, o más precisamente del movimiento browniano, de la membrana liposomal, lo que desestabiliza adicionalmente la membrana liposomal y aumenta el grado de escape del contenido.

Los liposomas pueden tener diversas composiciones químicas, siempre que puedan usarse para el propósito mencionado anteriormente. La preparación de liposomas es conocida en la técnica, incluyendo la preparación de liposomas que transportan agentes activos a un sitio objetivo específico (administración específica del sitio). Como se usa en la presente memoria, el término "selectivo" debe interpretarse ampliamente, y abarca el uso de la unión antígeno-anticuerpo, unión ligando-receptor y otras interacciones químicas de unión, así como medios no químicos. También se refiere al uso de liposomas desarrollados para seleccionar un objetivo específico dentro de un sujeto o muestra de prueba utilizando componentes, restos o grupos objetivo, como se conoce en la técnica. También se refiere a la selección pasiva, por ejemplo, mediante la acumulación mediada por el efecto EPR.

De acuerdo con la presente invención, las nanopartículas magnéticas tienen preferiblemente un diámetro del núcleo de entre 2 nm y 10 nm, más preferiblemente entre 2 nm y 8 nm, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 nm. Preferiblemente, las nanopartículas magnéticas están integradas en la membrana liposomal.

El término "agente activo", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a cualquier compuesto suficiente para obtener el resultado deseado, y puede incluir agentes terapéuticos, agentes nutricionales y similares. En el contexto de la presente invención, el término "agente activo" se usa indistintamente con "ingrediente activo" y términos similares. La naturaleza del agente activo no está particularmente limitada y puede, para el uso terapéutico, incluir pequeñas moléculas orgánicas, enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, carbohidratos y nanopartículas. Para el uso nutricional, el agente activo puede incluir, por ejemplo, microbios, prebióticos, vitaminas, oligoelementos y antioxidantes.

Preferiblemente, el agente activo es un agente citostático, tal como irinotecano, vinorelbina, gemcitabina, gefinitib, paclitaxel, taxotere, cisplatino, carboplatino, BCNU, CCNU, DTIC, melfalano, ciclofosfamida, ara A, ara C, etopósido, vincristina, vinblastina, actinomicina D, 5-fluorouracilo, metotrexato, herceptina, mitomicina C, o combinaciones de los mismos. Otro agente activo preferido es un antioxidante. Dentro de la presente invención, el/los agente(s) activo(s) está(n) localizado(s) preferiblemente en el interior del liposoma, es decir, la cavidad formada por la membrana liposomal, pero también, o adicionalmente, puede incorporarse en la membrana liposomal o unirse a la superficie del liposoma (es decir, el exterior de la membrana liposomal).

La composición liposómica de la presente invención es particularmente ventajosa porque permite monitorear si la selección del objetivo ha tenido éxito como condición para iniciar la liberación de la carga (por ejemplo, el/los agente(s) activo(s)), y posteriormente también controlar y, si es necesario, ajustar el grado de liberación de una manera fiable y conveniente. Para obtener imágenes de los tejidos objetivo para controlar el transporte y al mismo tiempo transportar los agentes activos a dichos tejidos objetivo, la etiqueta de imagenología mencionada anteriormente puede unirse al exterior de los liposomas o incrustarse en la membrana. Además, la liberación de un agente activo transportado en el interior de un liposoma se puede evaluar al monitorear el cambio en la señal que se origina del agente activo o, preferiblemente, de la liberación concomitante de un agente de imagenología al medio objetivo (es decir, un tejido objetivo).

Por consiguiente, la composición de la presente invención permite el transporte de un agente activo a un sitio objetivo y al mismo tiempo también permite (i) monitorear la distribución de los liposomas en el tejido objetivo (por ejemplo, mediante etiquetas de imagenología asociadas o unidas al exterior de la membrana liposomal) y / o (ii) evaluar la liberación, incluido el grado de liberación, del agente activo monitoreando el cambio de una señal antes y después de la liberación, como una señal fluorescente, de un agente de imagenología transportado por, preferiblemente encapsulado en, el liposoma. Por ejemplo, un agente de imagenología puede conducir a una señal de fluorescencia detectable solo después de la liberación del liposoma en el tejido circundante, o la intensidad de la señal puede cambiar significativamente, o puede haber cambios en las características de la señal, por ejemplo, en su espectro, lo que permite monitorear el grado de liberación concomitante del agente de imagenología y, si es necesario, controlar la liberación, por ejemplo, ajustando adecuadamente el AMF y / o la actividad de SMasa. Hasta este punto, la magnitud de la señal de la etiqueta de imagenología puede servir como referencia para determinar la cantidad relativa de liposomas que han liberado su contenido (o carga) (caracterizado por los cambios de señal del agente de imagenología) respecto de todos los liposomas en el volumen objetivo (caracterizado por la etiqueta de imagenología).

La composición de la presente invención es, por lo tanto, adecuada para la liberación del agente activo controlada enzimáticamente y magnéticamente, y para el uso en el monitoreo de los liposomas, en donde se utilizan etiquetas de imagenología o agentes de imagenología para el seguimiento, la localización y la cuantificación de la concentración

de los liposomas y / o para controlar la liberación de los agentes activos y / o para monitorear los niveles de esfingomielinasa cerca de los liposomas.

La composición de la presente invención puede consistir solamente en los liposomas descritos en la presente memoria, o comprender compuestos, ingredientes o sustancias adicionales. Se observa que el término "comprender", como se usa en la presente memoria, pretende abarcar tanto el término abierto "incluye" como el término cerrado "consiste en". Preferiblemente, la composición de la presente invención incluye además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos o sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para el contacto con los tejidos de los mamíferos, especialmente los humanos. El término "vehículo", como se usa en la presente memoria, se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo mediante el cual se administra el ingrediente activo. Además, se pueden incluir una o más sustancias activas adicionales en la composición de la presente invención que se administran conjuntamente con los liposomas. Además, la composición puede contener sustancias farmacéuticamente aceptables adicionales, por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes solubilizantes, tensioactivos, modificadores de la tonicidad y similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición liposomal como se describe en la presente memoria para el uso en la terapia y / o el diagnóstico. Como ya se mencionó, la composición de la presente invención se puede usar de manera particularmente ventajosa simultáneamente para fines tanto terapéuticos como de diagnóstico, o secuencialmente, es decir, primero en el uso de diagnóstico y luego en el uso terapéutico o nutricional, en donde la composición de la presente invención que se usará para fines de diagnóstico es muy similar o idéntica a la composición que se usará para el uso terapéutico o nutricional, excepto por la falta de incorporación de el/los agente(s) terapéutico(s) activo(s). Mediante el uso de uno o varios agentes de diagnóstico (es decir, agentes / etiquetas de imagenología), se puede evaluar el transporte, la acumulación en el objetivo y el patrón de liberación para un paciente determinado con el fin de seleccionar el compuesto candidato óptimo. Posteriormente, los agentes terapéuticos o nutricionales que coinciden con el agente de diagnóstico óptimo pueden administrarse al paciente. Este tipo de aplicación se conoce comúnmente como "diagnóstico complementario" y la invención descrita en la presente memoria es particularmente adecuada para este tipo de enfoque, ya que permite que los compuestos incorporados estén tan bien protegidos que el patrón de transporte, acumulación y liberación del agente de diagnóstico, por un lado, y el agente terapéutico o nutricional, por otro lado, son generalmente muy similares, lo que permite la selección precisa del mejor agente terapéutico o nutricional entre los compuestos candidatos ensayados.

El uso en la terapia típicamente incluye el transporte y la liberación selectiva de un agente activo en el sitio de tratamiento, y el uso en el diagnóstico incluye típicamente el uso de la composición como medio de imagenología. La composición se usa generalmente en una cantidad tal que se administra una cantidad eficaz de el/los agente(s) activo(s) al sujeto que lo necesita. Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, en particular los resultados terapéuticos deseados. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosis, y no se pretende limitarla a una formulación o vía de administración particular.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición liposomal como se describe en la presente memoria para el uso en el tratamiento del cáncer y / o para el uso en el diagnóstico del cáncer, tal como el cáncer de cabeza y cuello. Por ejemplo, las líneas celulares de SCC pueden seleccionarse a través de la inyección parenteral de liposomas SM que contienen cisplatino encapsulado e ICG. Se sabe que esta línea celular de cáncer secreta aSMasas, y se pueden formar imágenes de la acumulación. Los liposomas que contienen ceramida se pueden activar para producir el escape del contenido con un pulso de AMF local.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para transportar y liberar un agente activo en un sitio objetivo, que comprende las siguientes etapas

- (a) proporcionar una composición liposomal como se describe en la presente memoria,
- (b) administrar la composición liposomal para transportar los liposomas contenidos en la composición liposomal a un sitio objetivo; y
- (c) aplicar energía a los liposomas y / o aumentar la actividad de SMasa en el sitio objetivo para efectuar la liberación de al menos un agente activo.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el método incluye la etapa adicional (etapa (d)) de monitorear la liberación del agente activo midiendo una señal de un primer agente de imagenología antes de aplicar energía a los liposomas y / o aumentar la actividad de SMasa en el sitio objetivo, y medir una señal del primer agente de imagenología durante y / o después de aplicar energía a los liposomas y / o aumentar la actividad de la SMasa en el sitio objetivo, en donde un cambio (es decir, un aumento o disminución) de la intensidad de dicha señal indica un aumento del grado de escape del contenido de los liposomas y la liberación del contenido de los liposomas (es decir, de al menos un agente activo y, generalmente, dicho primer agente de imagenología). La magnitud de la señal de la etiqueta de imagenología puede servir como referencia para determinar la cantidad relativa de liposomas que han liberado su contenido (o etiquetas) (caracterizado por los cambios de señal del agente de imagenología) respecto de

todos los liposomas en el volumen objetivo (caracterizado por la etiqueta de imagenología).

Además, el método comprende preferiblemente la etapa adicional (etapa (e)) de ajustar (o controlar) el grado de liberación del agente activo ajustando el AMF y / o la actividad de SMasa en el sitio objetivo. Además, el método también puede incluir la etapa adicional de monitorear la localización o acumulación de los liposomas en el sitio objetivo por medio de un segundo agente de imagenología, también denominado en la presente memoria "etiqueta de imagenología" o "etiqueta de imagenología pasiva". El segundo agente de imagenología está asociado o unido preferiblemente a la superficie exterior de la membrana liposomal.

Esta etapa adicional se puede realizar después de la etapa (b), pero antes de la etapa (c). Permite determinar si la selección del objetivo ha sido eficaz y, si es así, realizar la etapa (c) para efectuar la liberación del agente activo y, preferiblemente, el primer agente de imagenología.

La energía aplicada en la etapa (c) generalmente da como resultado una transición de fase y / o cambio de la estructura de la membrana y / o calentamiento de la membrana liposomal, efectuando así la liberación de al menos un agente activo (y cualquier agente de imagenología opcionalmente presente en el interior del liposoma). Generalmente, la energía se aplica por medio de las nanopartículas magnéticas bajo la aplicación de un AMF en el sitio objetivo. La actividad de la SMasa en la etapa (c) puede aumentarse administrando la SMasa desde el exterior (SMasa exógena) o aplicando medios para inducir la actividad de la SMasa endógena. Dichos medios pueden incluir, por ejemplo, la irradiación, la exposición a la luz UV, la aplicación de calor y la administración de agentes quimioterapéuticos.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones dependientes adjuntas y en la siguiente descripción detallada de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra esquemáticamente un liposoma SM magnetoenzimático de acuerdo con la presente invención. (A) Ilustración esquemática de liposomas SM que contienen nanopartículas de Fe_3O_4 incrustadas en la membrana lipídica (estructuras globulares de color gris oscuro dentro de la membrana liposomal de bicapa lipídica) y una carga de moléculas de imagenología (*) y / o moléculas de fármacos (\diamond) dentro del liposoma. (B) Imagen de TEM del liposoma SM (sin tinción de membrana) con nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm aglomeradas en la membrana lipídica. C. Imagen de TEM de un liposoma SM sin nanopartículas de Fe_3O_4 . La membrana liposomal se tiñó con acetato de uranilo.

La Fig. 2 muestra la validación de la encapsulación de agentes (de tratamiento y / o imagenología) y la evaluación del tamaño de los liposomas. Datos para liposomas SM que incorporan diferentes tipos de fármacos anticancerosos: (A) 0,5 mg / ml de doxorubicina, (B) 4 mg / ml de cisplatino, (C) 0,7 mg / ml de paclitaxel; o para liposomas SM que incorporan diferentes tipos de agentes de imagenología: (D) 0,5 mg / ml de verde de indocianina (ICG). Paneles superiores: curva de elución típica de una columna PD-10 para liposomas DSPC:SM:DOTAP:Col (20:30:20:30) con nanopartículas de Fe_3O_4 (recubiertas con catecol-PEG400 y grupo carboxilo) en la membrana, que contienen la carga respectiva; la fracción número tres en el volumen de 4,2 ml, que contenía los liposomas intactos, se recogió para su uso posterior. Paneles inferiores: distribución del radio medio de los liposomas SM medido con el análisis de dispersión dinámica de luz.

La Fig. 3 muestra la evaluación de las señales fluorescentes de agentes libres y encapsulados. (A) Efecto de la rotura de la membrana lipídica para doxorubicina en liposomas SM. Recipientes de reacción Eppendorf superiores horizontales y verticales: Liposomas SM con doxorubicina y nanopartículas de 5 nm de Fe_3O_4 antes (recipiente de reacción Eppendorf horizontal) y después (recipiente de reacción Eppendorf vertical) de que los liposomas SM se hayan roto con una solución de EtOH al 49%. Recipientes de reacción Eppendorf inferiores horizontales y verticales: liposomas SM con doxorubicina (sin nanopartículas de Fe_3O_4) antes (recipiente de reacción Eppendorf horizontal) y después (recipiente de reacción Eppendorf vertical) de que los liposomas SM se hayan roto con una solución de EtOH al 49%. (B) Efecto de la rotura de la membrana lipídica para ICG (con nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm) en liposomas SM antes (parte inferior derecha) y después (parte superior izquierda) del tratamiento con la solución de EtOH al 49% para romper la membrana lipídica.

La Fig. 4 muestra la evaluación de la permeación de un liposoma SM mediante SMasa. (A) Rotura de liposomas *in vitro* mediante SMasa. Contenido de lípidos 20 μmol , contenido de SM 6 mmol. La intensidad de fluorescencia relativa (RFI) detectada por el ensayo de horquilla de ADN FRET se muestra en función de los diferentes niveles de exposición a SMasa. (B) Alteración de liposomas *in vitro* por la secreción de aSMasa por las células endoteliales aórticas humanas (HAoEC) inducida por el estrés por radiación con niveles de exposición que oscilan entre 0 y 15 Gy. La actividad de aSMasa se midió usando el kit de ensayo de actividad de la esfingomielinasa de Cayman Chemical.

La Fig. 5 muestra la absorción de potencia específica (SPA, W / g) de las nanopartículas de Fe_3O_4 en un medio de liposomas y libres en agua y expuestas a un AMF de 23 mT a 828 kHz. Se compararon varias concentraciones de nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm incrustadas en liposomas SM cargados con ICG (1,2 mg / ml, 0,6 mg / ml, 0,3 mg / ml y 0,15 mg / ml) con nanopartículas de 20 nm y 5 nm de Fe_3O_4 libres en agua (las dos columnas más a la izquierda). A concentraciones óptimas de 0,3 mg / ml, las nanopartículas incrustadas de 5 nm muestran valores de SPA 10 veces más altos en comparación con las partículas de 5 nm libres en agua. Tras la adición de SMasa en cantidades suficientes para desestabilizar la membrana de los liposomas y liberar los óxidos de hierro de las membranas, el SPA

de las partículas de 5 nm se redujo por debajo del límite de detección.

La Fig. 6 muestra los resultados obtenidos para los liposomas SM en un ensayo de escape del contenido. Las dos barras de la izquierda muestran los resultados de los liposomas SM que contienen nanopartículas de Fe_3O_4 (DSPC:SM:DOTAP:Col (20:30:20:30) mol / mol) con exposición a AMF (1,5 mT, 100 kHz), y las dos barras de la derecha muestran el resultado para los liposomas SM sin nanopartículas de Fe_3O_4 (SM / DSPC / Col (30:40:30) mol / mol) y sin exposición a AMF. Las barras blancas indican que no hay exposición a SMasa, y las barras oscuras indican una exposición a SMasa de 0,8 U / ml. La exposición tanto a SMasa como a AFM dio como resultado una tasa de escape del contenido que fue aproximadamente tres veces mayor en comparación con SMasa sola o con AMF solo.

La Fig. 7 muestra los resultados obtenidos para diferentes formulaciones de fármacos en un ensayo de escape del contenido de liposomas. Los liposomas SM se hicieron de DSPC:SM:DOTAP:Col (20:30:20:30 mol / mol) con nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm (0,6 mg / ml). (A) Formulación de doxorrubicina (0,5 mg / ml). Barra izquierda: sin exposición a AMF y SMasa, barra intermedia: solo AMF (5 mT, 229 kHz), barra derecha: AMF (5 mT, 229 kHz) después de 30 minutos de pretratamiento con SMasa (0,8 U / ml). (B) Formulación de cisplatino (4 mg / ml). Barra izquierda: sin exposición a AMF y SMasa, barra intermedia: solo AMF (23 mT, 823 kHz), barra derecha: AMF (23 mT, 823 kHz) después de 30 minutos de tratamiento con SMasa (0,8 U / ml). (C) Formulación de paclitaxel (0,7 mg / ml). Barra izquierda: sin exposición a AMF y SMasa, barra derecha: AMF (23 mT, 823 kHz) después del tratamiento previo con 30 minutos de SMasa (0,8 U / ml). (D) Escape de doxorrubicina (0,5 mg / ml) de los liposomas SM después de 1 h de incubación con células PC-3 expuestas a aSMasa inducida por radiación de 36 Gy (izquierda) y sin irradiación (derecha).

La Fig. 8 ilustra el tratamiento del cáncer en un modelo de ratón utilizando liposomas SM de acuerdo con la presente invención. (A) Dibujo esquemático de la configuración experimental utilizada en los experimentos de AMF para el tratamiento del carcinoma oral de células escamosas (SCC). La parte superior de la bobina se coloca cerca del tumor y el tumor se expone al tratamiento con AMF. (B) Visualización de la liberación de un marcador de imagenología de liposomas SM en un modelo de ratón ortotópico de carcinoma de células escamosas orales SCC4. El ICG encapsulado en liposomas SM que contienen nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm no produce una señal fluorescente visible antes del tratamiento con AMF (izquierda), pero conduce a una señal fluorescente claramente visible después de la liberación debido al tratamiento con AMF (20 min, 1,5 mT, 100 kHz).

Descripción detallada de la invención

La presente invención combina la acción enzimática junto con la liberación de liposomas que contienen nanopartículas magnéticas activada por AMF, lo que da como resultado una liberación más específica y más selectiva que la que se puede lograr a las concentraciones fisiológicas de SMasa encontradas en diversas enfermedades, y con rangos de AMF adecuados para su uso en el ámbito clínico.

Los portadores de liposomas de la invención presentan un mecanismo de liberación específico controlable externamente que permite la ruptura del liposoma cuando está en el lugar correcto y cuando es necesario, lo que conduce a la liberación de la carga. Para este propósito, se combinan dos mecanismos diferentes: (a) la degradación de la esfingomielina como componente lipídico del liposoma por la acción enzimática de la SMasa secretada por las células patológicas, por ejemplo, en el cáncer y en la inflamación, y (b) las nanopartículas magnéticas utilizadas para desestabilizar la membrana del liposoma por la acción de AMF, induciendo así el escape del contenido.

Además, la secreción de SMasa ácida o neutra puede mejorarse mediante irradiación localizada, diversos estimuladores del estrés como los lipopolisacáridos, la interrupción de la señalización de integrina, la luz UV, el calor, el estrés oxidativo y la acumulación de Cu^{2+} , la participación del factor activador de plaquetas, los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, etopósido, gemcitabina, fenretinida, paclitaxel, rituximab, daunorrubicina, Ara-C y doxorrubicina), o puede activarse a través de miembros de la superfamilia de receptores de TNF (Fas, CD40, DR5 y TNF α). Estos estimuladores del estrés pueden usarse para inducir el aumento de SMasa en el sitio de la enfermedad, lo que puede liberar otros compuestos, que pueden activar de nuevo más aSMasa y, por lo tanto, multiplicar el efecto del fármaco en el sitio de la enfermedad.

Dentro del contexto de la presente invención, también se puede usar SMasa de fuentes externas. Hay varios parásitos, cepas bacterianas y virus que utilizan SMasa en su ciclo vital. Esta innovación permite que el uso de estas fuentes no humanas de SMasa se detecte y se utilice para la liberación e imagenología selectivas. Esto incluye, por ejemplo, bacterias secretoras de SMasa como *B. cereus* (Oda et al., 2010), *C. pneumonia* (Penate Medina et al., 2014), y *S. aureus* (Hedstrom y Malmqvist, 1982), patógenos observados con frecuencia en ambientes hospitalarios, como contaminantes en alimentos y bebidas y en superficies de materiales que incluyen, por ejemplo, implantes.

Para los liposomas de esfingomielina (SM) de acuerdo con la invención, se pueden usar SMs que se dan habitualmente, como 16:0 SM, 16:0 SM (d18:1/16:0), 17:0 SM (d18:1/17:0), 18:0 SM (d18:1/18:0). El contenido de SM de los liposomas está en el intervalo del 10 al 45 %mol. En el contexto de la presente invención, el contenido de SM está en el intervalo del 10 al 45 %mol o del 15 al 40 %mol, por ejemplo, del 20 al 35 %mol o del 25 al 35 %mol. La cantidad de SM como sustrato para SMasa debe ser suficiente para inducir la creación de plataformas ricas en ceramida que hagan que los liposomas sean sensibles al tratamiento con AMF. Se debe alcanzar un nivel de

aproximadamente un 5% de ceramida en la membrana para que se formen los dominios ricos en ceramida (Sot et al., 2006) y del 10% de ceramida en la membrana para que ocurra la formación de vesículas (Nurminen et al., 2002).

Además, se pueden usar otros lípidos que forman liposomas, tales como los seleccionados del grupo que consiste en fosfolípidos, tocoferoles, esteroides (por ejemplo, colesterol y derivados del mismo, ergosterol y derivados del mismo, lanosterol y derivados del mismo), glicoproteínas y mezclas de los mismos. Los fosfolípidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: (1) fosfatidilcolina (PC) (por ejemplo, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dilinoleoilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina disaturada (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), PC de huevo, PC de soja hidrogenada); (2) fosfatidilglicerol (PG) (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), PG de huevo); (3) fosfatidiletanolamina (por ejemplo, dimetilfosfatidiletanolamina (DMPG), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE)); (4) fosfatidilserina (PS) (por ejemplo, dioleoilfosfatidilserina (DOPS)); (5) ácido fosfatídico (por ejemplo, ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA), ácido diestearoilfosfatídico (DSPA)); (6) Derivados PEGilados de (1) a (5); (6) otros lípidos (por ejemplo, cloruro de N-(2,3-di-(9-(Z)-octadeceniloxi)-prop-1-il-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DO-TAP)), y sus combinaciones.

Los liposomas adecuados para el uso en la presente memoria comprenden al menos una esfingomielina en una cantidad del 10 al 45 %mol, 15 al 40 %mol, 20 al 35 %mol o 25 al 35 %mol) y al menos un lípido seleccionado del grupo que consiste en: fosfatidilcolina (PC) (por ejemplo, DPPC, DSPC, DOPC y DMPC) en una cantidad total de aproximadamente 10 al 85 %mol (por ejemplo, 15 al 50 %mol, 15 al 40 %mol o 20 al 35 %mol), colesterol (o derivados de los mismos) en una cantidad del 5 al 40 %mol (por ejemplo, 10 al 35 %mol o 20 al 30 %mol), fosfatidiletanolamina (por ejemplo, DMPE, DPPE, DSPE) en una cantidad total del 0,1 al 30 %mol (por ejemplo, 0,1 al 20 %mol, o 1 al 10 %mol), fosfatidilserina (por ejemplo, DOPS) en una cantidad total del 1 al 35% (por ejemplo, 5 al 25% o 10 al 20 %mol), DOTAP y / o DOTMA en una cantidad total del 5 al 40 %mol (por ejemplo, 5 al 30 %mol, 5 al 20 %mol o 10 al 25 %mol), y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, los otros lípidos que forman liposomas (es decir, lípidos además de los lípidos SM como se definen anteriormente) pueden ser: colesterol 10-30 %mol, fosfatidilcolina (PC) 25-80 %mol, lípidos catiónicos (DOTAP) 5-20 %mol, fosfatidiletanolamina (PE) 0,1-10 %mol, o fosfatidilserina (PS) 5-20 %mol. El tamaño preferido de los liposomas es de 50 a 300 nm, más preferiblemente de 80 a 250 nm, lo que permite la filtración estéril antes de la inyección *in vivo* (utilizando filtros estériles estándar de 0,22 micrones), pero puede llegar hasta los 800 nm.

En consecuencia, en el curso de la acción de la SMasa sobre membranas mixtas de SM / fosfatidilcolina, la ceramida generada forma microdominios (Nurminen et al., 2002). En términos de química física, esto representa una transición isotérmica desencadenada por una reacción enzimática, causando un cambio en el diagrama de fases de lípidos desde la fase desordenada fluida hasta la región de dos fases, que consiste en las fases desordenada fluida y ordenada sólida, esta última enriquecida en ceramida. Esta transición isotérmica alterará permanentemente el estado del liposoma antes y después de la escisión enzimática. Antes de la acción de SMasa, el liposoma es rígido y no presenta escapes, y después de la acción de SMasa, el liposoma es frágil e inestable. Esta inestabilidad de la membrana lipídica permite aumentar el escape del contenido al aplicar calor o al inducir un movimiento lateral creciente en la membrana, lo que resulta en una mayor desestabilización de la membrana. Estos efectos pueden generarse por inducción del AMF a través de esferas aglomeradas en la membrana y / o por fuentes de calor externas como ultrasonidos, láser o sondas de calentamiento.

Los liposomas, también denominados portadores primarios, según la invención pueden portar agentes médicos, agentes de diagnóstico, agentes nutricionales, sensibilizadores a la radiación, agentes de contraste, enzimas, ácidos nucleicos, anticuerpos, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, carbohidratos, un grupo selectivo o combinaciones de los mismos.

Para la liberación del agente activo controlado magnetoenzimáticamente por un AMF sobre la acción de la SMasa, el tamaño del núcleo de las nanopartículas de Fe_3O_4 puede estar en el rango de 2 a 10 nm, preferiblemente 5 nm. También se pueden usar otras partículas magnéticas, superparamagnéticas, paramagnéticas y ferromagnéticas en el mismo rango de tamaños. Las pequeñas nanopartículas se incorporan espontáneamente en la membrana. Las nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm recubiertas de carboxilo se asocian espontáneamente a la membrana (partículas de 5 nm con el grupo catecol-PEG-COOH). Cuando las nanopartículas en el torrente sanguíneo tienen un tamaño de 2 a 10 nm, pueden eliminarse por el riñón. Las nanopartículas de óxido de hierro son, por lo tanto, preferiblemente de 10 nm o más pequeñas, pero mayores o iguales a 2 nm. La eliminación por el riñón es difícil o casi imposible si el tamaño de partícula es mayor de 10 nm en ratones. En los seres humanos, no se ha establecido la forma y el tamaño exactos del umbral renal, pero se cree que son comparables y varían con la edad y la salud del paciente.

La intensidad del campo magnético para la liberación del fármaco por AMF puede estar en el rango de 0,3 mT a 60 mT, y la frecuencia de modulación del campo en el rango de 100 a 1000 kHz. La aplicación del AMF puede ser totalmente local y puede realizarse después o durante la imagenología, lo que permite el control total del proceso. Por otro lado, el hecho de que la actividad de la SMasa solo esté asociada con enfermedades graves proporciona un seguro contra la liberación de los agentes en áreas de enfermedad falsas positivas o la acumulación fuera del objetivo que surgirá naturalmente de la distribución desigual de los liposomas en el cuerpo.

La mayor sensibilidad a la AMF en presencia de SMasa brinda ventajas para la aplicación clínica, ya que puede permitir el uso de bobinas de superficie para generar el AMF. Las pequeñas bobinas portátiles permiten la inducción selectiva del AMF solo en los sitios tumorales. Esto evita a las otras partes del cuerpo la liberación del fármaco de los liposomas y el calentamiento. Se sabe que la disipación de energía, es decir, la generación de calor, depende linealmente de la frecuencia, aumenta con la segunda potencia del campo magnético, y para bobinas de superficie disminuye con la tercera potencia de la distancia. Si bien esto permite una exposición más selectiva espacialmente, también puede limitar el uso de pequeñas bobinas de superficie fuera del cuerpo de los pacientes. Debido al efecto sinérgico de SMasa y AMF, el campo magnético efectivo utilizado puede ser menor, y de esta manera se mejora la facilidad de uso de las bobinas de superficie para iniciar la liberación del fármaco liposomal. Aunque también sería posible colocar a un paciente dentro de una bobina magnética, esto requiere campos magnéticos más altos que, debido a los riesgos médicos, podrían aumentar la complejidad del procedimiento y estar contraindicados para algunos pacientes (por ejemplo, con marcapasos) y para el personal médico.

A diferencia de los liposomas SM sensibles a la "magnetoenzima" que, cuando se exponen al AMF, solo se abrirán cerca de patologías que expresan SMasa, los liposomas "termosensibles" descritos en el estado de la técnica no demuestran dicha liberación selectiva; todos los liposomas en el campo magnético se volverán permeables una vez que se genere un cierto nivel de energía. Además, en esos sistemas, el calentamiento de los tejidos circundantes continúa incluso después de que se hayan roto los liposomas mientras continúe la exposición al AMF. Además, los liposomas termosensibles, si están equipados con marcadores de imagenología que cambian los patrones de emisión tras la liberación del agente, producirán señales independientes del estado de SMasa del objetivo enfermo. Por lo tanto, carecen de la información mediada por SMasa específica del sitio sobre la actividad de la enfermedad reflejada en la señal del marcador de imagenología liberado, una ventaja crítica en la evaluación del estado de la enfermedad que permite regular y, por lo tanto, optimizar la agresividad de la terapia.

La combinación de control de imagenología y tasas de liberación mediadas por la enfermedad proporciona los componentes necesarios para realizar un sistema de bucle de retroalimentación para una terapia adaptativa y controlada. Dado que la exposición al AMF permite ajustar la sensibilidad de la liberación a niveles detectables de modulación de la señal de imagen para niveles variables de expresión de SMasa, esta invención también se puede usar para seguir el estado fisiopatológico del cáncer o la gravedad de la inflamación mediante el monitoreo de la liberación de liposomas SM causada por la SMasa secretada en el sitio de la enfermedad. El nivel del AMF requerido para detectar un cierto nivel de liberación de un marcador reflejaría los niveles de expresión de SMasa, por ejemplo, asociados con la apoptosis, y por lo tanto puede indicar tanto la eficacia del tratamiento farmacológico como la gravedad de la enfermedad.

Esta invención también puede proporcionar métodos mejorados para eliminar el fármaco que no alcanzó la patología objetivo prevista. Para la mayoría de los fármacos contra el cáncer, del 95,0 al 99,9% del fármaco inyectado nunca se asocia al tejido objetivo y los receptores objetivo (para un ejemplo que involucra doxorubicina, véase Gasselhuber et al., 2012). Esta carga de fármacos fuera del objetivo causa efectos adversos que limitan la facilidad de uso del fármaco. La invención permite que el fármaco encapsulado circule en la sangre sin interactuar con el tejido fuera del objetivo. La eliminación del fármaco fuera del objetivo se puede lograr de varias maneras diferentes, por ejemplo, extrayendo los liposomas SM de óxido de hierro fuera del objetivo con un imán de la sangre (por ejemplo, en un entorno similar a la diálisis).

La incorporación de nanopartículas de hierro en los liposomas se realizó con el objetivo de mejorar la eficacia de liberación del fármaco y un mejor control de la liberación del fármaco. Una nanopartícula ideal se asociaría espontáneamente con la membrana, pero se disociaría después de que el liposoma deje escapar el contenido, ya que esto daría lugar a un patrón de calentamiento autolimitado, evitando la generación innecesaria de calor que podría provocar efectos secundarios indeseables. Como nanopartículas para la acción magnética, los inventores utilizan partículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con carboxilo (partículas de Fe_3O_4 con catecol-PEG-COOH, AC Diagnostics, Fayetteville, AR, EE.UU.). Se incorporan espontáneamente pequeñas nanopartículas de hierro a las películas lipídicas. Esto puede deberse a las cargas opuestas de las nanopartículas y la DOPA de los liposomas. Por otro lado, se sabe que el fosfato que se encuentra en los grupos de la cabeza de los fosfolípidos funciona como un estabilizador de las nanopartículas de hierro. También se sabe que los catecoles tienen tendencia a abandonar las nanopartículas, y de esta manera permiten que los iones fosfato interactúen con el núcleo de hierro.

Una ilustración esquemática de los liposomas SM que contienen nanopartículas de hierro incrustadas en la membrana lipídica estabilizada por los fosfatos de los lípidos y que contiene la carga (Fig. 1A) muestra que el agente activo de la carga puede estar en el compartimento acuoso dentro del liposoma. Sin embargo, como alternativa, también se puede incrustar o unir a la membrana. Debido a que las partículas aisladas que contienen hierro son demasiado pequeñas para generar suficiente calor en soluciones acuosas bajo un AMF (Goya et al., 2008), deben agruparse como se muestra en la figura 1B. Esta figura presenta la imagen de TEM de los liposomas SM con nanopartículas de Fe_3O_4 de 5 nm. La aglomeración de las nanopartículas se puede ver claramente. Las imágenes de TEM muestran una asociación clara de las nanopartículas de 5 nm en la membrana y grandes aglomerados en la membrana. Los aglomerados también hacen que la membrana se abombe. En la membrana de los liposomas de control teñidos sin partículas de hierro, se ven contornos simétricos suaves en la imagen de TEM (Fig. 1C).

La adición de nanopartículas de Fe_3O_4 no afecta al escape de contenido. En los liposomas catiónicos, las

nanopartículas de Fe_3O_4 se asocian en los liposomas aunque estén estabilizadas por catecol-PEG 400. Esto podría deberse a la disociación del recubrimiento de catecol-PEG de las nanopartículas de Fe_3O_4 y a la asociación de las nanopartículas de Fe_3O_4 con grupos fosfato de los fosfo- y esfingolípidos. El fosfato es un estabilizador conocido de las nanopartículas de hierro y, en este sentido, las partículas de hierro podrían estabilizarse en la interfaz lipídica del agua liposomal donde los grupos de cabeza cargados están disponibles sin estabilizadores adicionales como los catecoles. La unión de las nanopartículas de hierro a la membrana también podría reforzarse con las cargas superficiales opuestas de la membrana del liposoma y la superficie hierro-nanopartícula. La asociación de nanopartículas de hierro en la membrana liposomal depende del estado de la membrana y es reversible. Las partículas pueden disociarse de la membrana si el estado de la membrana cambia, por ejemplo, cuando se forman microdominios ricos en ceramida en la membrana.

El PEG 400 se puede usar como enlazador solubilizante del catecol estabilizador con un PM total de 760. Este complejo estabilizador-enlazador es un orden de magnitud más pequeño que los estabilizadores estéricos eficientes conocidos. También se sabe que los catecoles son más inestables que los nitrocatecoles y pueden disociarse de las nanopartículas. Estos dos hechos permiten que la partícula interactúe con los fosfatos circundantes de los fosfolípidos. Las nanopartículas que tienen catecol DOPA y PEG más cortos de 1000 Da tienen tendencia a asociarse de manera flexible con los fosfolípidos cuando DOPA PEG se puede reducir, y esto puede ayudar a las nanopartículas a aglomerarse en la membrana (Isa et al., 2010, y Goldmann et al., 2010). Es posible considerar el uso de otros estabilizadores como ácido oleico, silano, fosfato y dopamina, ya que estos estabilizadores pueden modificarse con una gran variedad de grupos, siempre que la partícula se asocie y se disocie de la membrana.

Normalmente, los dispersantes más estables, como nitro-DOPA-PEG5000, proporcionan una capa densa y delgada que es lo suficientemente gruesa como para evitar la aglomeración de las nanopartículas. Los PEG de 5000 Da a 10000 Da son las nanopartículas más estables que no permiten la aglomeración y la interacción de la nanopartícula de hierro con la película lipídica. Reimult et al. (2012) utilizaron partículas de Fe de aproximadamente el mismo tamaño que en la presente invención, pero utilizaron nanopartículas magnéticas, que se estabilizaban utilizando nitrocatecoles con anclajes de palmitoilo de alta afinidad para establecer un recubrimiento hidrófobo delgado pero muy denso, que se puede incorporar en una membrana. Los nitrocatecoles son más estables y forman menos radicales que los catecoles (Amstad et al., 2009, y Amstad et al., 2010). Sin embargo, este enlace y anclaje de nitrocatecol es extremadamente estable y casi irreversible, y hace que la eliminación de las nanopartículas del cuerpo sea extremadamente difícil porque los anclajes de palmitoilo pueden anclar el complejo a cualquier membrana.

Se utilizaron SM comunes, que pueden estar en una membrana de bicapa de liposomas como 16:0 SM, 16:0 SM (d18:1/16:0), 17:0 SM (d18:1/17:0), 18:0 SM (d18:1/18:0). En la presente invención, los lípidos utilizados se han probado ampliamente en el ámbito clínico y, por lo tanto, son aceptables para su traslado al ámbito clínico.

Los liposomas SM que contenían fármacos, ICG y nanopartículas de hierro fueron estables, y la eficiencia de encapsulación fue generalmente buena. La doxorubicina (0,5 mg / ml) se encapsuló utilizando un gradiente de pH y la eficiencia de la encapsulación fue alta, como se pudo observar en las curvas de elución de filtración en gel. En una curva de elución típica de una columna PD-10 para liposomas DSPC:SM:DOTAP:Col (20:30:20:30) con nanopartículas de Fe_3O_4 (recubiertas con catecol-PEG400 y grupo carboxilo), la fracción número tres contenía los liposomas intactos y se recogió para su uso posterior (Fig. 2A). La encapsulación de cisplatino (4 mg / ml) se realizó combinando el fármaco con los lípidos cuando los lípidos y el cisplatino se hidrataron. La fracción número tres contenía los liposomas intactos y se recogió para su uso posterior (Fig. 2B). Se encapsuló paclitaxel (0,7 mg / ml) disolviendo paclitaxel en la mezcla de lípidos cuando estaba en cloroformo. La fracción número tres contenía los liposomas intactos y se recogió para su uso posterior (Fig. 2C). Se encapsuló ICG (0,5 mg / ml) con una estrategia similar y se añadió después de la formación de la película lipídica. La fracción número tres contenía los liposomas intactos y se recogió para su uso posterior (Fig. 2D). La homogeneidad y la distribución de tamaños se verificaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS).

Para hacer que los liposomas sean más fáciles de romper, se pueden crear más frágiles, más fluidos, usando cantidades más bajas de colesterol y / o usando ácidos grasos insaturados en la mezcla de lípidos. Cuando se usan estos tipos de liposomas, quizás incluso cantidades más pequeñas de SMasa, como las que se encuentran en las infecciones, podrían ser suficientes para romper los liposomas, pero los liposomas más débiles tienen una semivida de almacenamiento más corta y son propensos a los escapes de contenido en el torrente sanguíneo. Los liposomas SM DSPC, por otro lado, tienen una gran capacidad de carga de fármaco, un largo periodo de almacenamiento y tiempos en circulación robustos. Los liposomas SM DSPC pueden utilizarse para mantener los liposomas siempre intactos en situaciones fisiológicas. La incorporación de nanopartículas de hierro los hace vulnerables solo en caso de exposición a campos magnéticos que inducen una transición de fase. En este caso, la sensibilidad inicial a bajas concentraciones de SMasa puede reducirse, pero se podría lograr un mejor control de la liberación.

En general, los liposomas de, o usados en, la presente invención no son termosensibles. El término "no termosensible", como se usa en la presente memoria, significa preferiblemente que los liposomas no son sensibles (es decir, son estables, en particular en el sentido de que no se producen escapes de contenido, es decir, fármacos u otros agentes activos) en el rango típico de temperaturas corporales (por ejemplo, 36-38 ° C o 36,5-37,5 ° C).

Los liposomas que están compuestos de lípidos que tienen una T_m de 55 ° C para DSPC, 41 ° C para esfingomielina

y 4 ° C para DOTAP colesterol son rígidos y no termosensibles. También son estables, con un periodo de almacenamiento de varias semanas. Si no se exponen a SMasa (por ejemplo, aSMasa), las transiciones de fase de los liposomas con, por ejemplo, esfingomielina, colesterol, fosfatidilcolina y DOTAP se producen entre 60-75 ° C, dependiendo de la concentración de SM y de los lípidos auxiliares (es decir, todos los lípidos, excepto los SM). Estos liposomas no son termosensibles. Por lo tanto, en ausencia de exposición a SMasa (con o sin AMF), no es posible la liberación del fármaco. Para las variantes que contienen óxido de hierro, los liposomas de esta rigidez tampoco tienen escapes de contenido, incluso al exponerlos a AMF. Después del tratamiento con SMasa, el calor inducido, ya sea directamente o por ultrasonidos, u otro dispositivo térmico, funcionaría tan bien como el AMF, pero la aplicación de calor a las partes internas del cuerpo de manera selectiva y controlada es un desafío. Los liposomas SM descritos en la presente memoria permiten la permeabilización incluso con un AMF de baja energía (es decir, energías que no aumentan la temperatura del tejido a más de 40 ° C). Por lo tanto, esto evita el calor y otros daños (por ejemplo, por la exposición a niveles más altos de radiación ionizante para inducir niveles más altos de SMasa).

El nivel y la distribución espectral de la fluorescencia de ICG dependen de la concentración de ICG y del medio local. In vitro, la fluorescencia de ICG es más brillante a una concentración de 80 mg / ml y, por encima de ella, la fluorescencia disminuye rápidamente cuando aumenta la concentración (Mordon et al., 1998). En los experimentos presentados en la presente memoria, la concentración liposomal de ICG fue de 750 µg / ml, pero la concentración local real fue varias veces mayor porque ICG estaba atrapado en los liposomas y posiblemente en la bicapa liposomal. Esto conduce a un apagamiento eficiente en los liposomas catiónicos (Hua et al., 2012). El mismo fenómeno de extinción se aplica a los liposomas de doxorubicina: la fluorescencia de la doxorubicina aumenta 10 veces cuando se libera desde los liposomas. La fluorescencia de doxorubicina se puede usar para controlar la liberación (Kheirolo-moom et al., 2010).

Para probar si las propiedades de fluorescencia de ICG y doxorubicina podrían usarse para controlar si los agentes están libres o encapsulados en los liposomas, se realizó el siguiente experimento. Se encapsuló doxorubicina (con o sin nanopartículas de óxido de hierro) o ICG en liposomas. Después de romper la membrana de los liposomas con etanol al 49%, se observó un aumento de la señal de fluorescencia tanto para la doxorubicina libre (Figura 3A) como para el ICG libre (Figura 3B). Este efecto puede explicarse por el efecto de apilamiento de orbitales p-p (Hua et al., 2012). Por lo tanto, el efecto se puede aprovechar para monitorear la liberación desde los liposomas y también para detectar sitios patológicos de alta expresión de SMasa, y la exposición a AMF se usará para llevar las señales de imagen a niveles detectables y monitorizables. Dicha monitorización puede ser muy informativa cuando se realiza durante la cirugía: se puede usar la imagen intraoperatoria con marcadores del infrarrojo cercano, como el ICG, encapsulados en liposomas SM para detectar el tejido tumoral con el fin de verificar la cirugía eficaz, es decir, la extirpación completa de todo el tejido tumoral. Estas señales ópticas también pueden ser útiles como entrada para el control de dispositivos de cirugía robotizada.

Con el fin de mostrar que el tratamiento con SMasa puede liberar las moléculas atrapadas en la luz de los liposomas, se realizó una prueba de horquilla liposomal. Se observó un aumento dependiente de la dosis de la señal fluorescente asociada a la exposición a SMasa cuando se liberó el ADN en horquilla de los liposomas. Con este modelo de horquilla liposomal, se podría demostrar que hay escapes de contenido en los liposomas que contienen SM cuando la concentración de SMasa alcanza las 0,5 U / ml (Figura 4A). La Figura 4B demuestra que el nivel de aSMasa requerido para la permeación de los liposomas SM puede ser producido por las células, en este caso las células endoteliales aórticas humanas (HAoEC), expuestas a niveles de radiación ionizante aplicada en condiciones clínicas como en la radioterapia contra el cáncer.

El efecto del AMF aplicado sobre las nanopartículas que contienen hierro en el medio liposomal o acuoso y con diferentes concentraciones y tamaños de nanopartículas se estudió con más detalle mediante el análisis de los valores de absorción de potencia específica (SPA) (W / g). También se estudió el efecto sobre la SPA de la exposición del sistema de liposomas que contienen hierro a SMasa. Se investigaron liposomas SM que contenían ICG con varias concentraciones de nanopartículas de hierro de 5 nm. Para la comparación, se analizaron nanopartículas de hierro de 20 nm y 5 nm libres en agua (Figura 5). Se hicieron tres observaciones sorprendentes.

Primero, se midió un aumento de diez veces en los valores de SPA cuando las partículas de 5 nm se acoplaron a los liposomas a niveles de concentración óptimos ("lipo 0,3 mg / ml", Figura 5) en comparación con cuando estuvieron libres en el medio acuoso ("5 nm, agua", Figura 5). Cuando las pequeñas nanopartículas de hierro de 5 nm se aglomeran en la membrana lipídica, permiten el calentamiento de los liposomas. En un estado aglomerado óptimo en la membrana liposomal, las partículas de hierro de 5 nm alcanzan valores de SPA de aproximadamente un tercio de los valores de SPA de las partículas de hierro de 20 nm.

En segundo lugar, el aumento de la absorción de potencia depende de la concentración de las nanopartículas en el medio liposomal. Todavía hay un límite: en una membrana lipídica solo hay espacio para una cantidad limitada de partículas aglomeradas, y esto define el límite superior para los valores de SPA. Si se agregan más partículas a la membrana, simplemente no se distribuyen de manera óptima en la membrana, y eso da como resultado valores de SPA más bajos.

En tercer lugar, el efecto de SPA para las nanopartículas que contienen hierro de 5 nm en la membrana liposomal se desvanece tras la exposición a SMasa presente en la solución ("lipo, 0,6 mg / ml SMasa" en comparación con "lipo,

0,6 mg / ml" en la Figura 5). Esto podría explicarse por la formación de microdominios ricos en ceramida que pueden destruir la aglomeración de las partículas dentro de la membrana. Las partículas liberadas de la bicapa al medio acuoso circundante perderían la capacidad de calentamiento supranormal provocada por la aglomeración.

5 También se estudió si hay sinergia para la liberación de fármacos cuando se usa AMF y SMasa. Se utilizaron campos magnéticos relativamente bajos y se eligieron cantidades de enzimas para simular las condiciones fisiológicas. Se midió el escape de contenido del ICG de liposomas que contenían ICG con y sin tratamiento con AMF y SMasa. Si bien el tratamiento con enzimas solo o la exposición a AMF solo podría inducir un efecto de escape de contenido limitado, se produjo un aumento sinérgico inesperado de 3 veces de escape de ICG en los liposomas mediante la exposición combinada a enzimas y campos magnéticos (Figura 6).

10 En conjunto, estas diversas observaciones sorprendentes revelan un patrón de activación de liberación de fármaco muy favorable para los liposomas SM con nanopartículas de tamaño muy pequeño (5 nm) que pueden aglomerarse adecuadamente en la membrana del liposoma: un efecto magnetoenzimático sinérgico permite alcanzar niveles de absorción de energía lo suficientemente altos como para causar el escape del contenido de los liposomas SM siempre que estén expuestos a SMasa. Y una vez que los liposomas se han vuelto más propensos al escape del contenido debido a la exposición a la SMasa, la absorción de energía se reduce al mínimo, lo que reduce cualquier transferencia de calor adicional innecesaria a los tejidos circundantes después de que se haya liberado la carga. Esta característica se puede aprovechar para mejorar la ventana terapéutica del AMF, ya sea reduciendo los posibles efectos secundarios del calentamiento o permitiendo una mejora segura de la absorción de energía (adaptando las frecuencias y la intensidad del campo magnético) para mejorar la liberación de fármacos activos.

20 Con el fin de confirmar que la liberación no solo es factible para los marcadores de imagenología, sino también que el sistema portador magnetoenzimático también se puede usar para la liberación de fármacos, se realizaron experimentos adicionales. Se encapsularon doxorubicina, cisplatino y paclitaxel y se documentó su liberación desde los liposomas SM encapsulantes mediante el uso del efecto sinérgico de la exposición combinada a SMasa y AMF (Figura 7). La configuración experimental fue similar a la de los ensayos de escape de contenido liposomal descritos anteriormente, exponiendo el portador a SMasa y / o al tratamiento con AMF a diferentes intensidades y frecuencias de campos magnéticos.

25 La Figura 7A muestra los resultados de la formulación liposomal de doxorubicina para un tratamiento con AMF a 5 mT con 229 kHz, mientras la Figura 7B muestra resultados similares para la formulación liposomal de cisplatino con un tratamiento con AMF a 23 mT con 823 kHz. La exposición adicional a 0,8 U / ml de SMasa condujo a un aumento de la tasa de liberación, documentando que una intensidad de campo magnético relativamente baja puede ser suficiente, lo que puede facilitar la aplicación clínica.

30 En la Figura 7C se presentan los resultados de otra formulación liposomal, en este caso para paclitaxel, con un tratamiento de AMF a 23 mT con 823 kHz. En los experimentos de liberación de las Figuras 7A-C se ha demostrado que los fármacos pueden liberarse mediante la exposición combinada a SMasa y AMF de una manera similar a los ensayos de liberación de ICG. Los resultados varían para diferentes fármacos, y son más impresionantes para la formulación de doxorubicina, que mostró un aumento de más de 10 veces en el caso de la exposición a SMasa adicional, que se logra a una intensidad de campo magnético relativamente baja de 5 mT.

35 En el caso de la doxorubicina, se investigó la tasa de escape del contenido de los liposomas cuando se exponen a aSMasa expresada por células PC-3 al someter a las células a 36 Gy de radiación ionizante (Fig. 7D). La expresión extracelular de SMasa y la ceramida inducida por SMasa son reacciones importantes al estrés celular y la apoptosis, comúnmente observadas en la inflamación y el cáncer. Por lo tanto, el hallazgo de que se puede usar SMasa para romper tipos específicos de liposomas, es decir, liposomas SM, hace que sea un objetivo interesante diseñar sistemas de transporte de fármacos para la liberación de fármacos desencadenada de forma endógena. 2 U / ml de SMasa son suficientes para romper los liposomas SM, pero este es un nivel que rara vez se alcanza en entornos patofisiológicos típicos. Se ha informado que la actividad de la SMasa de 0,5 U / ml puede conducir a una muerte celular del 80% en células de cáncer de colon HT-29 (Colell et al., 2002).

40 La figura 6 muestra que 30 minutos de incubación con 0,8 U / ml de SMasa no es suficiente para liberar el contenido solo, pero la exposición adicional a AMF conduce a una tasa de escape de contenido de más del 50%. Esto apoya el uso de liposomas SM cargados con nanopartículas que contienen hierro como vehículos de transporte de fármacos: una vez acumulados en los sitios de expresión patológica de SMasa, el tratamiento con AMF llevará a la liberación de su carga, incluidos los fármacos y / o marcadores de imagenología.

45 Usando una configuración experimental como se muestra en la Figura 8A, se probó si se podía observar *in vivo* el apagamiento de ICG asociado con la liberación del liposoma y observado *in vitro* (Figura 3). Se inyectaron liposomas SM que contenían nanopartículas de Fe₃O₄ cargadas con ICG en la vena de la cola de un ratón que albergaba un xenoinjerto ortotópico de SCC4. Los liposomas circularon durante 15 minutos, luego se expuso al animal a AMF (20 minutos a 1,5 mT, 100 kHz). El tratamiento con AMF se dirigió al tumor debajo de la mandíbula, como se muestra en la Figura 8A. La imagenología en el infrarrojo cercano se realizó en una cámara de imagenología de fluorescencia NightOWL 1 hora después de la inyección. Como control, se inyectó a los ratones la misma composición liposomal, pero no se sometieron a tratamiento con AMF. El ICG que escapó se pudo ver claramente en el área del tumor debajo

de la barbilla del ratón tratado con AMF (Fig. 8B, derecha) pero no en el ratón de control (Fig. 8B, izquierda). Este fenómeno con el apagamiento de ICG cuando está encapsulado en los liposomas se muestra en la Figura 3B.

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

5 Formulaciones de liposomas

Los lípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids y la SMasa (de *B. cereus*) de Sigma Aldrich.

a) Liposomas cargados con doxorubicina:

10 Los liposomas se hicieron utilizando una mezcla de lípidos que consistió en un total de 20 μM de lípidos DPPC / Colesterol / SM / DOTAP o DSPC / colesterol / SM / DOTAP (20:30:30:20 %mol, respectivamente). Para encapsular la doxorubicina en los liposomas, se utilizó un gradiente de pH. Los lípidos almacenados en cloroformo se pipetearon en un matraz de fondo redondo, se secaron bajo nitrógeno y se liofilizaron durante 24 h para eliminar las trazas de cloroformo. Los lípidos se dejaron hidratar durante 30 minutos, a 50 ° C en el caso de DPPC y a 60 ° C para DSPC, en 1 ml de una solución tampón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mM, NaCl 150 mM, pH 4,1 que contenía hierro en una concentración final de 0,6 o 0,3 mg / ml después de la purificación con PD-10 (partículas de Fe_3O_4 recubiertas con catecol-PEG400 y grupo carboxilo).

15 La solución de liposomas se congeló y descongeló 3 veces y se prepararon liposomas unilamelares con un sonicador de punta de aguja (5x15 s a baja energía sobre hielo). El tampón se cambió a PBS pH 6,5 utilizando una columna PD-10. Tanto la doxorubicina (doxorubicina 1,4 mM para lípidos 10 μM) como los liposomas se precalentaron a 50 ° C si se usó DPPC y a 60 ° C si se usó DSPC y luego se combinaron y se incubaron durante 30 minutos a 50 ° C o 60 ° C en un baño de agua. Los liposomas se purificaron de los compuestos sin unir usando una columna PD-10. Las curvas de elución se establecieron utilizando la absorbancia de doxorubicina a 485 nm. Los liposomas se controlaron mediante mediciones del tamaño de los liposomas usando la dispersión de luz dinámica (DLS).

b) Liposomas cargados de cisplatino:

25 Los liposomas se prepararon utilizando una mezcla lipídica de DSPC / colesterol / SM / DOTAP (20:30:30:20 %mol, respectivamente) que consistió en un total de 20 μM de lípidos. Los lípidos almacenados en cloroformo se pipetearon en un matraz de fondo redondo, se secaron bajo nitrógeno y se liofilizaron durante 2 h para eliminar las trazas de cloroformo. Los lípidos se dejaron hidratar durante 30 minutos en soluciones acuosas tamponadas a 60 ° C que contenían cisplatino (9 mM) y nanopartículas de hierro a una concentración final de 0,6 o 0,3 mg / ml después de la purificación con PD-10 (partículas de Fe_3O_4 recubiertas con catecol-PEG400 y grupo carboxilo). La solución de liposomas se congeló y descongeló 10 veces. La extrusión se realizó 11 veces a través de una membrana de policarbonato de 100 nm utilizando una extrusora de pequeño volumen, o se prepararon liposomas unilamelares usando un sonicador con punta de aguja (4x15 s a baja energía en hielo). Los liposomas se purificaron de los compuestos sin unir usando una columna PD-10. Las curvas de elución se obtuvieron utilizando la absorbancia de cisplatino (a 301 nm en HCl 0,1 M). Los liposomas se controlaron mediante mediciones del tamaño de los liposomas usando DLS.

c) Liposomas cargados con Paclitaxel:

40 Los liposomas se prepararon utilizando una mezcla lipídica de DSPC / colesterol / SM / DOTAP (20:30:30:20 %mol, respectivamente) que consistió en un total de 20 μM de lípidos. Los lípidos almacenados en cloroformo se pipetearon en un matraz de fondo redondo, se secaron bajo nitrógeno y se liofilizaron durante 2 h para eliminar las trazas de cloroformo. Se añadió paclitaxel a los lípidos (0,7 a 1 mg) y se liofilizaron las trazas de cloroformo durante la noche. Los lípidos y el paclitaxel se dejaron hidratar durante 30 minutos a 60 ° C en soluciones acuosas tamponadas que contenían nanopartículas de Fe_3O_4 (0,6 mg / ml o 0,3 mg / ml de concentración final). Las soluciones de liposomas se congelaron y descongelaron 7-10 veces. La extrusión se realizó 11 veces a través de una membrana de policarbonato de 100 nm utilizando una extrusora de pequeño volumen, o se prepararon liposomas unilamelares usando un sonicador con punta de aguja (5x15 s a baja energía en hielo). Los liposomas se purificaron de los compuestos sin unir usando una columna PD-10. Las curvas de elución se obtuvieron utilizando la absorbancia de paclitaxel (227 nm). Los liposomas se controlaron mediante mediciones del tamaño de los liposomas usando DLS.

d) Liposomas cargados con verde de indocianina (ICG):

50 Los liposomas se hicieron utilizando una mezcla de lípidos que consistió en un total de 20 μM de lípidos (DSPC / Colesterol / SM / DOTAP (20:30:30:20) en proporciones mol / mol). Los lípidos almacenados en cloroformo se pipetearon en un matraz de fondo redondo, se secaron bajo nitrógeno y se liofilizaron durante 2 h para eliminar las trazas de cloroformo. Los lípidos se dejaron hidratar durante 30 minutos a 60 ° C en soluciones acuosas tamponadas que contenían ICG (0,5 mg / ml) y nanopartículas de Fe_3O_4 a la concentración final 0,6 o 0,3 mg / ml después de la purificación en PD-10 (partículas de Fe_3O_4 recubiertas con catecol-PEG400 y grupo carboxilo). La extrusión se realizó 11 veces a través de una membrana de policarbonato de 100 nm utilizando una extrusora de pequeño volumen, o se

55

prepararon liposomas unilamelares usando un sonicador con punta de aguja (3x15 s a baja energía en hielo). Los liposomas se purificaron de los compuestos sin unir usando una columna PD-10. Las curvas de elución se obtuvieron utilizando la absorbancia de ICG a 800 nm. Los liposomas se controlaron mediante mediciones del tamaño de los liposomas usando DLS.

5 Ejemplo 2

Tratamiento con AMF

Los inventores utilizaron una bobina con una intensidad de campo magnético de 1,5 mT para los experimentos *in vivo* y la misma bobina de 1,5 mT, así como un dispositivo con una intensidad de campo variable que variaba de 5 a 23 mT para los estudios *in vitro*.

10 Los tratamientos con AMF se realizaron durante 20 min (100 kHz, 15 V, 1,5 mT) para cada muestra que contenía 300-500 ml de liposomas. Si una muestra se trató previamente, se agregaron 0,4 U de SMasa (actividad final de 0,77 U / ml) 30 minutos antes de aplicar el tratamiento con AMF. Después del tratamiento, las muestras se insertaron en una bolsa de diálisis SnakeSkin y se dializaron durante 24 h con PBS o PBS de pH 6,5 para analizar la cantidad de doxorubicina, cisplatino, paclitaxel o ICG libre. Después de 24 h de incubación, se analizaron ambas soluciones dentro
15 y fuera de la bolsa midiendo la absorbancia de doxorubicina, cisplatino, paclitaxel o ICG, y se calculó la tasa de escape del contenido.

También se generó un AMF utilizando la instrumentación de nanoScale Biomagnetics (nB, Zaragoza, España). En este caso, se utilizaron campos de 5-23 mT y 229-823 kHz. Se incubaron diferentes concentraciones (0,15 a 1,2 mg / ml de nanopartículas de Fe₃O₄ por 13 μmol / ml de lípidos en PBS) y también diferentes tamaños (5 a 20 nm) de nanopartículas de Fe₃O₄ durante 10 min en 5 - 23 mT en 750 ml, para estudiar tanto el escape del contenido de los liposomas como la hipertermia magnética, así como para analizar valores específicos de absorción de potencia.
20

Ejemplo 3

Detección de aSMasa

25 La detección de aSMasa se realizó con el kit de detección de aSMasa de Cayman Chemicals (EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de aSMasa se midieron 10 minutos después de la irradiación con 0 a 20 Gy de radiación gamma.

Ejemplo 4

Imagenología *in vivo*

30 Se realizaron experimentos de imagenología *in vivo* con ratones atómicos que tenían un carcinoma ortotópico SCC-4 en la región de la mandíbula inferior. Los animales se anestesiaron con ketamina (110 mg / kg de p.c.) / xilazina (16 mg / kg de p.c.) durante la manipulación y la obtención de imágenes.

Después de la purificación, se administraron liposomas que contenían fluoróforos de ICG y nanopartículas de Fe₃O₄ en un volumen de 150 ml mediante inyección en la vena de la cola. Se tomaron imágenes de los ratones con una cámara Berthold NightOWL (Berthold Technologies, Bad Wildbad). El análisis de las imágenes se realizó con el programa informático IndiGO. También se tomaron imágenes de ratones con un tomógrafo de fluorescencia (FMT 2500, Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) y bajo un microscopio quirúrgico (Moller-Wedel, Wedel, Alemania).
35

Los ratones se colocaron de modo que el tumor estuviera dentro de la bobina magnética del aparato de AMF. Se aplicó el AMF (1,5 mT y 100 kHz) al tumor durante 20 min. Se tomaron imágenes de los ratones después de una hora junto con los ratones de control que habían recibido la misma inyección liposomal, pero que no habían sido sometidos a AMF. Se mostró un claro incremento de la señal de ICG debido al ICG que escapó en el área del tumor debajo de la barbilla del ratón.
40

Referencias

45 Amstad et al., Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol- derived anchor group. Nano Lett., 2009, 9, 4042-8.

Amstad et al., Influence of electronegative substituents on the binding affinity of catechol-derived anchors to Fe₃O₄ nanoparticles. J. Phys. Chem., 2011, 115, 683-91.

Colell et al., Divergent role of ceramide generated by exogenous sphingomyelinases on NF-κB activation and apoptosis in human colon HT-29 cells. FEBS Lett., 2002, 28, 15-20.

50 Gasselhuber et al., Comparison of conventional chemotherapy, stealth liposomes and temperaturesensitive liposomes

- in a mathematical model, PLoS ONE, 2012, 7, e47453. doi:10.1371/.
- Goldmann et al., Biomimetic mussel adhesive inspired clickable anchors applied to the functionalization of Fe₃O₄ nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, 15, 1608-15.
- 5 Goya et al., Magnetic hyperthermia with Fe₃O₄ nanoparticles: the influence of particle size on energy absorption. *IEEE Transactions on Magnetics*, 2008, 44, 4444-7.
- Hannun et al., Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, 2001, 40, 4893-903.
- Hedstrom y Malmqvist. Sphingomyelinase activity of *Staphylococcus aureus* strains from recurrent furunculosis and other infections. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B.*, 1982, 90(3), 217-20.
- 10 Holopainen et al., Dimyristoylphosphatidylcholine/C16:0-ceramide binary liposomes studied by differential scanning calorimetry and wide- and smallangle x-ray scattering. *Biophys. J.*, 2000, 78, 2459-69.
- Hua et al., In vivo imaging of choroidal angiogenesis using fluorescence-labeled cationic liposomes. *Mol. Vis.*, 2012, 18, 1045-54.
- 15 Isa et al., Self-assembly of iron oxide-poly(ethylene glycol) core-shell nanoparticles at liquid-liquid interfaces. *CHIMIA*, 2010, 64, 145-9.
- Jaffrezou et al., Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.*, 1996, 15, 2417-24.
- Kheirilomoom et al., Copper-doxirubicin as a nanoparticle cargo retains efficacy with minimal toxicity. *Mol Pharm.*, 2010, 7, 1948-58.
- 20 Mordon et al., Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvascular Research*, 1998, 55, 146-52.
- Nurminen et al., Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *JACS*, 2002, 124, 12129-34.
- Oda et al. Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *BBA*, 2010, 1798, 1073-80.
- 25 Penate Medina, Enzymatic degradation induced drug release and imaging of sphingomyelin liposomes, COST TD1004 Action, Theranostics Imaging and Therapy: An Action to Develop Novel Nanosized Systems for Imaging-Guided Drug Delivery, 2013, 08, 17).
- Penate Medina et al., Identification of sphingomyelinase on the surface of *Chlamydia pneumoniae*: possible role in the entry into its host cells. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, ID de artículo 412827.
- 30 Reimhult et al., Nanoparticle actuated hollow drug delivery vehicles. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7, 145-64.
- Smith y Schuchman. The unexpected role of acidic sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *The FASEB Journal*, 2008, 22, 3419-31.
- Sot et al., Detergent-resistant ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys. J.*, 2006, 90, 903-14.
- 35 Stancevic y Kolesnick. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Letters*, 2010, 584, 1728-40.
- Strum et al., 1-P-D-habino-furanosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 15493-7.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende liposomas, y los liposomas comprenden:
 - (a) fosfolípidos, y los fosfolípidos comprenden esfingomielina (SM),
 - (b) nanopartículas magnéticas, y uno o ambos de
 - 5 (c) un agente de imagenología y / o una etiqueta de imagenología y
 - (d) al menos un agente activo,

en el que el contenido de esfingomielina de los liposomas está en el intervalo de 10 %mol a 45 %mol, y

en el que los liposomas son capaces de liberar un agente de imagenología y / o un agente activo en un medio objetivo por la acción concomitante de la esfingomielinasa (SMasa) y un campo magnético alterno (AMF).
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que las nanopartículas magnéticas tienen un diámetro del núcleo de entre 2 nm y 10 nm.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que las nanopartículas magnéticas comprenden un metal, aleación de metal, óxido de metal, hidróxido de metal, óxido de metal mixto, hidróxido de metal mixto, nitruro de metal, sulfuro de metal, nitruro de metal mixto o sulfuro de metal mixto, en donde el metal se selecciona del grupo que
- 15 consiste en cromo, manganeso, hierro, cobalto y níquel.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los liposomas comprenden además al menos un agente de imagenología, que incluye isótopos radiactivos, agentes de contraste, fluoróforos y marcadores de PET.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente activo es un agente citostático.
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los liposomas comprenden al menos un agente terapéutico, al menos un agente de imagenología y una etiqueta de imagenología.
7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso en la terapia y / o el diagnóstico.
8. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el uso en la terapia incluye el uso
- 25 de la composición para el transporte y la liberación selectivos de un agente activo en un sitio objetivo, y el uso en el diagnóstico incluye el uso de la composición como medio de imagenología.
9. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el uso en el tratamiento del cáncer y / o para el uso en el diagnóstico del cáncer.
10. Una composición para el uso en un método para transportar y liberar un agente activo en un sitio objetivo,
- 30 que comprende las siguientes etapas:
 - (a) proporcionar una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
 - (b) administrar la composición para transportar los liposomas contenidos en la composición a un sitio objetivo; y
 - 35 (c) aplicar energía a los liposomas y / o aumentar la actividad de SMasa en el sitio objetivo para efectuar la liberación de al menos un agente activo.
11. Una composición para el uso según la reivindicación 10, en la que la etapa de aplicar energía a los liposomas da como resultado una transición de fase y / o un cambio en la estructura de la membrana liposomal y / o el calentamiento de los liposomas para efectuar la liberación de al menos un agente activo.
12. Una composición para el uso según la reivindicación 10 o 11, en la que en la etapa (c) la energía se aplica
- 40 aplicando un campo magnético alterno en el sitio objetivo.
13. Una composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la actividad de la SMasa se incrementa administrando la SMasa exógena o aplicando medios para inducir la actividad de SMasa endógena para llevar a cabo la liberación de al menos un agente activo.
14. Una composición para el uso según la reivindicación 13, en la que los medios para inducir la actividad de
- 45 SMasa endógena incluyen la irradiación, la exposición a luz UV, la aplicación de calor y la administración de agentes quimioterapéuticos o inductores de estrés celular.

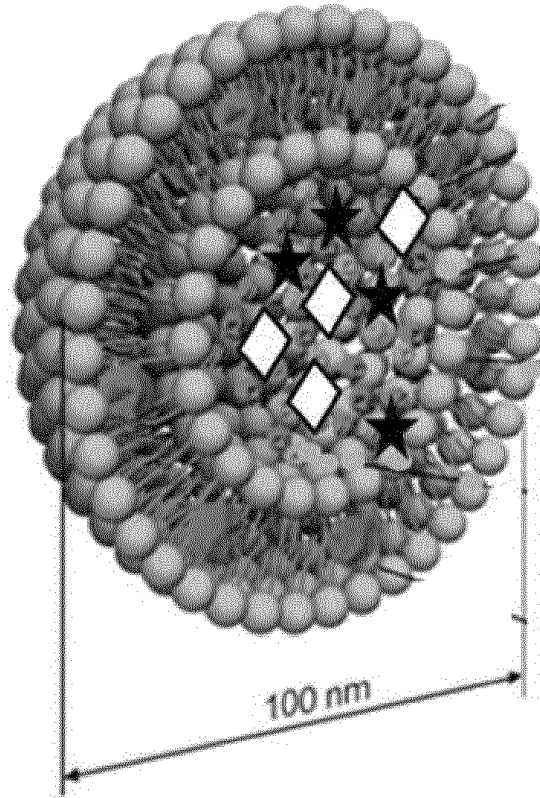


FIG. 1A

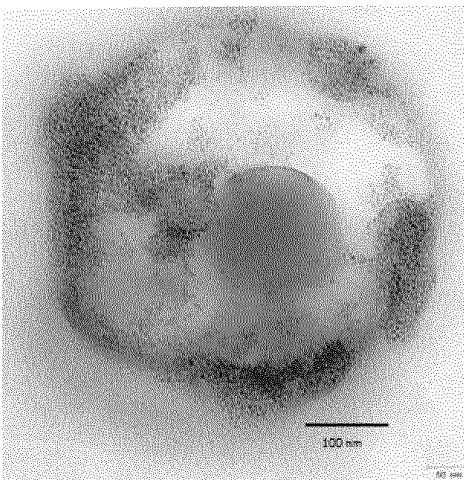


FIG. 1B

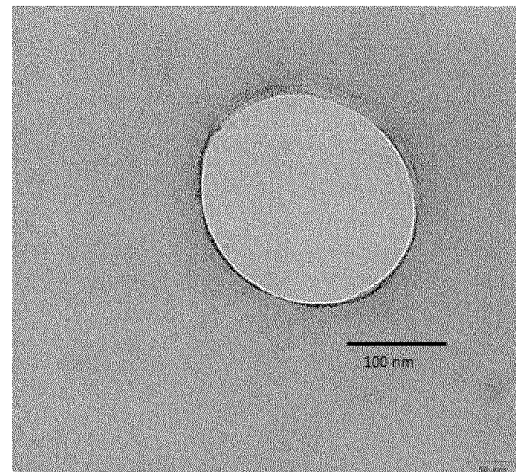


FIG. 1C

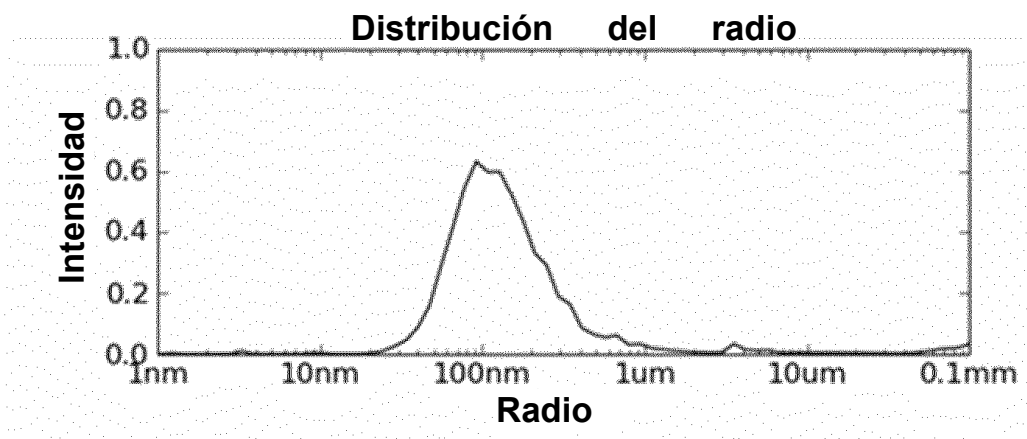
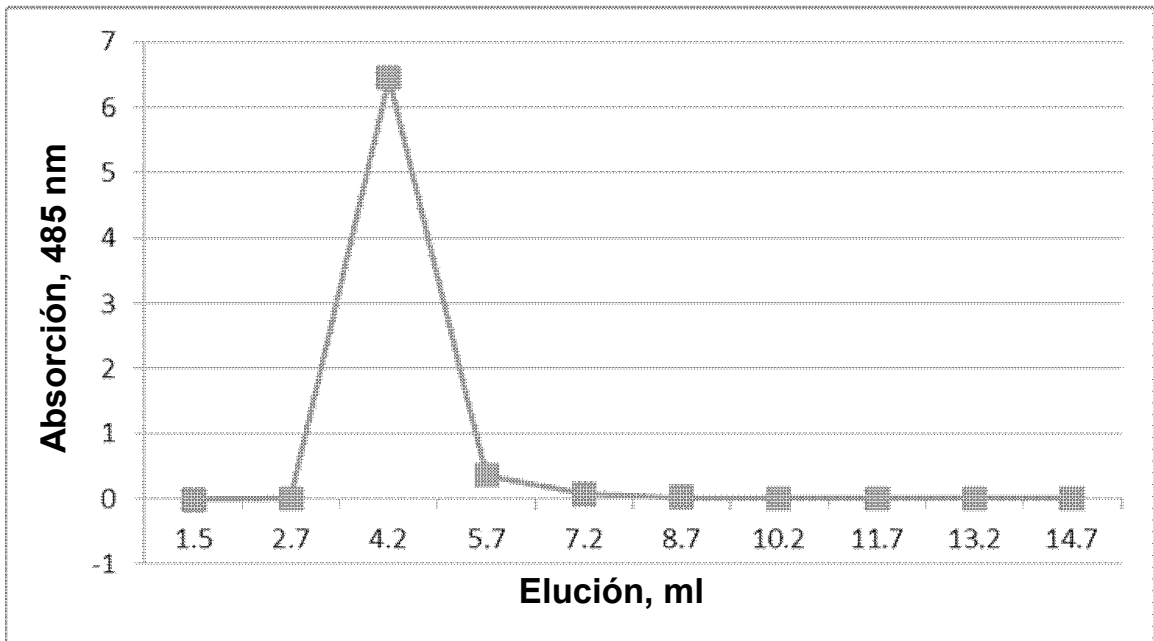


FIG. 2A

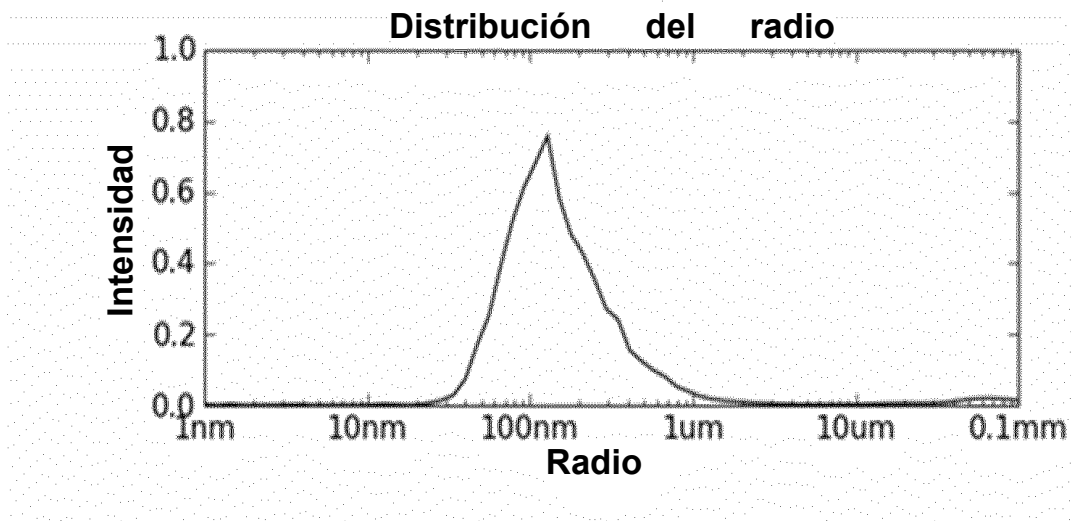
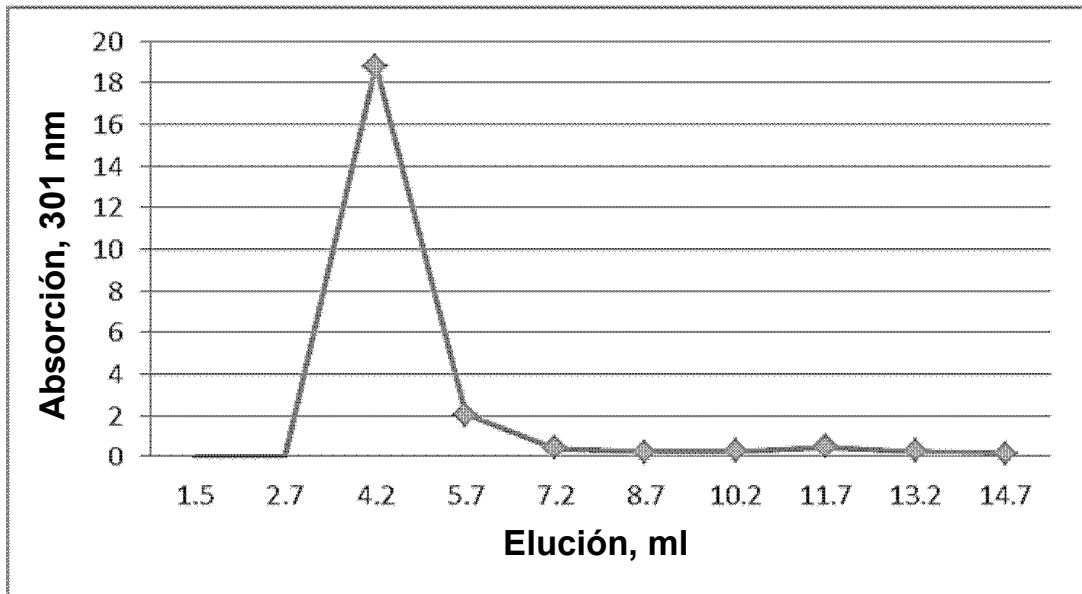


FIG. 2B

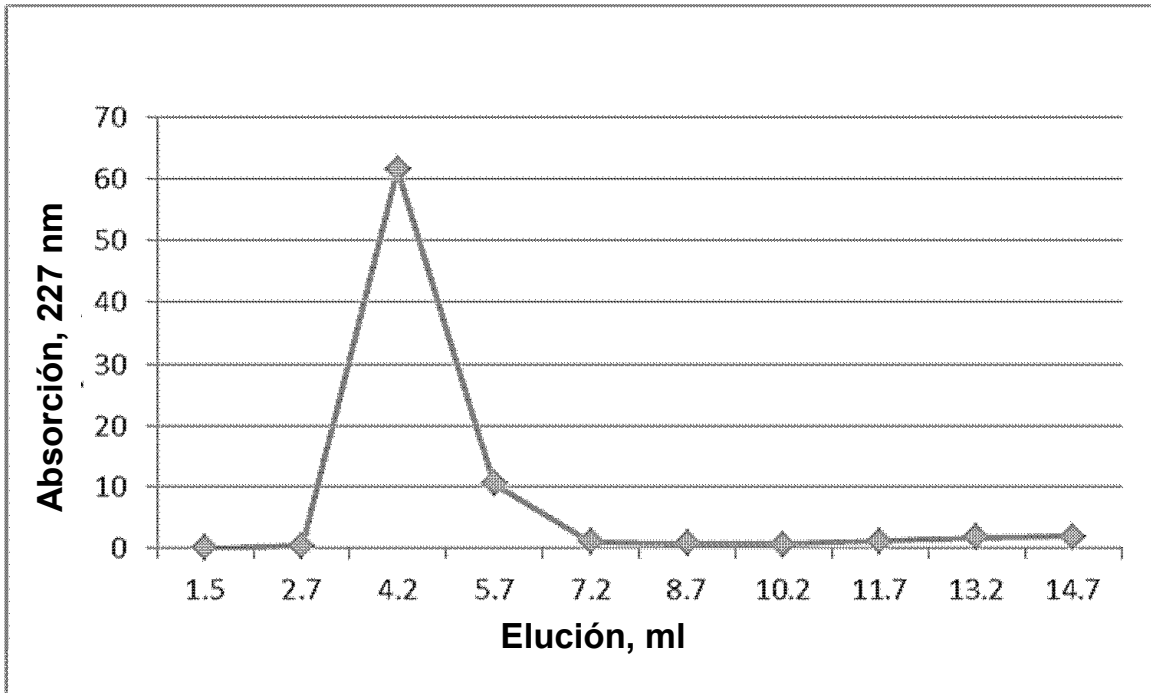


FIG. 2C

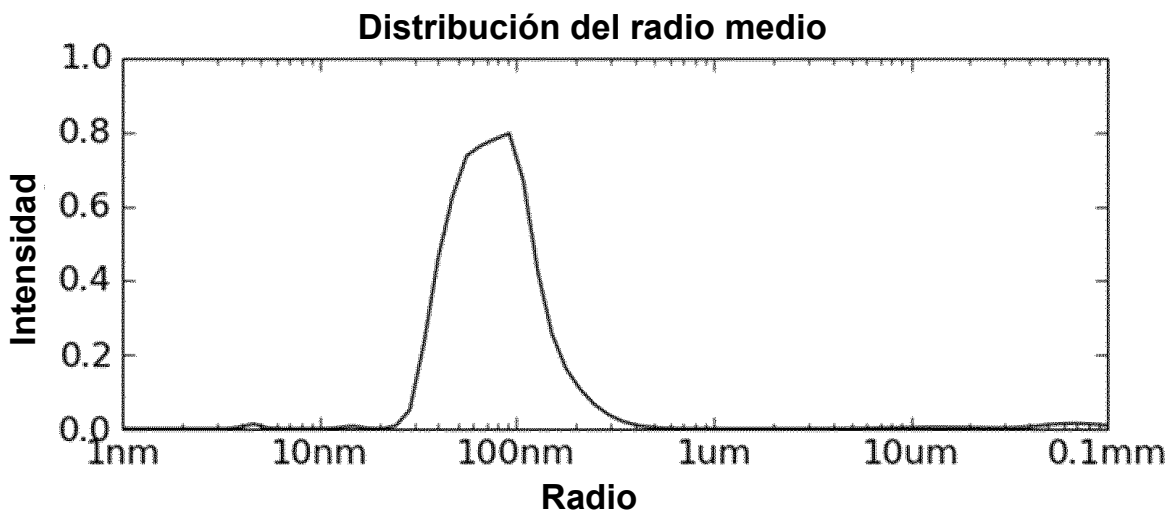
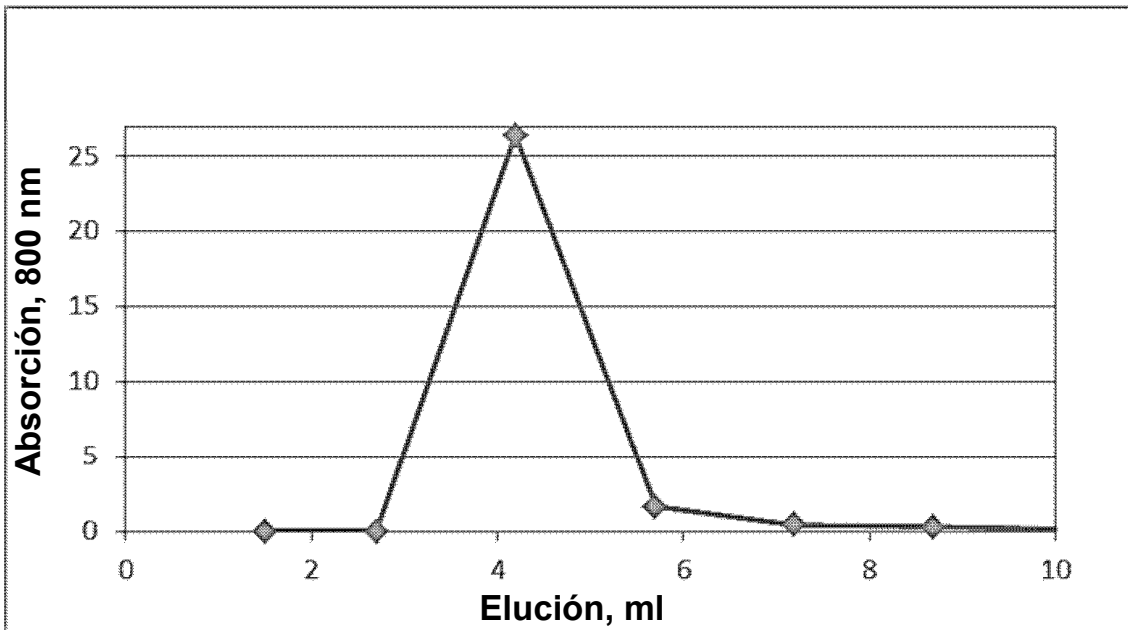


FIG. 2D

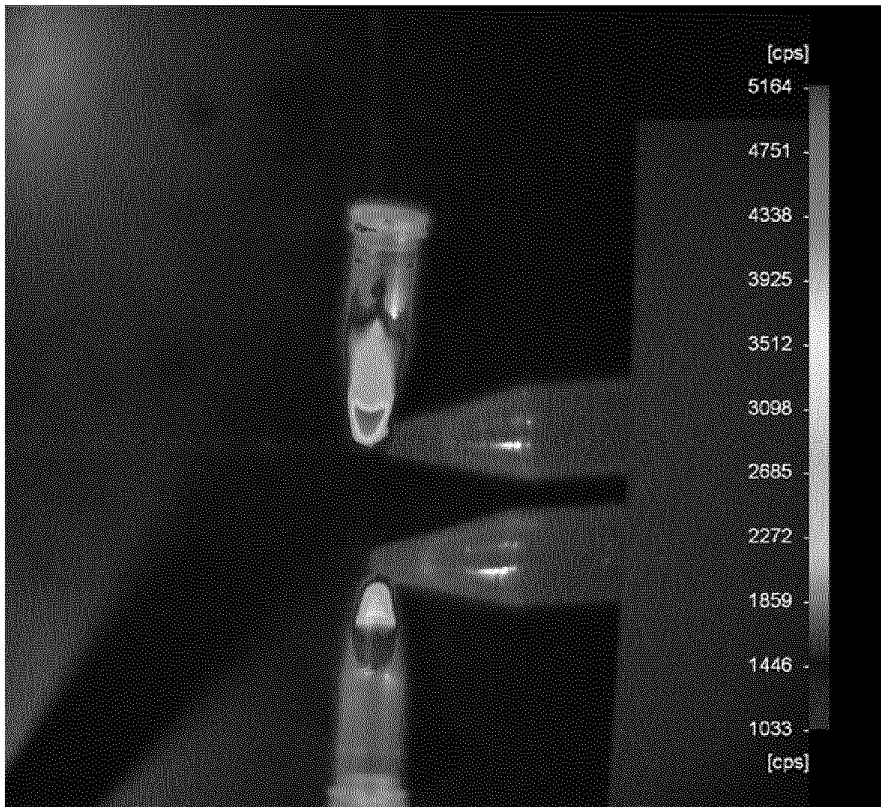


FIG. 3A

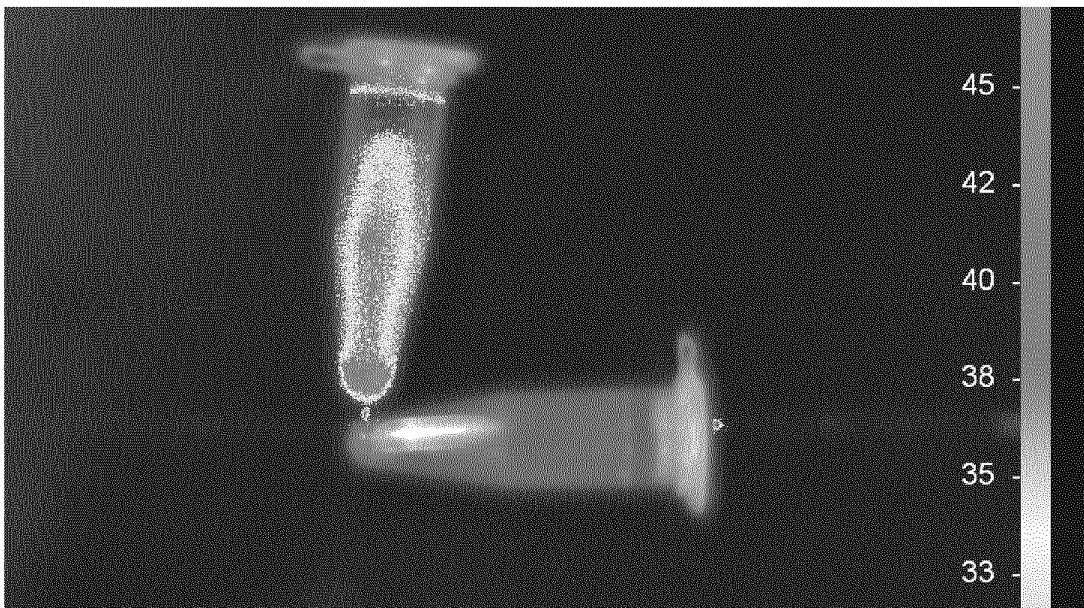


FIG. 3B

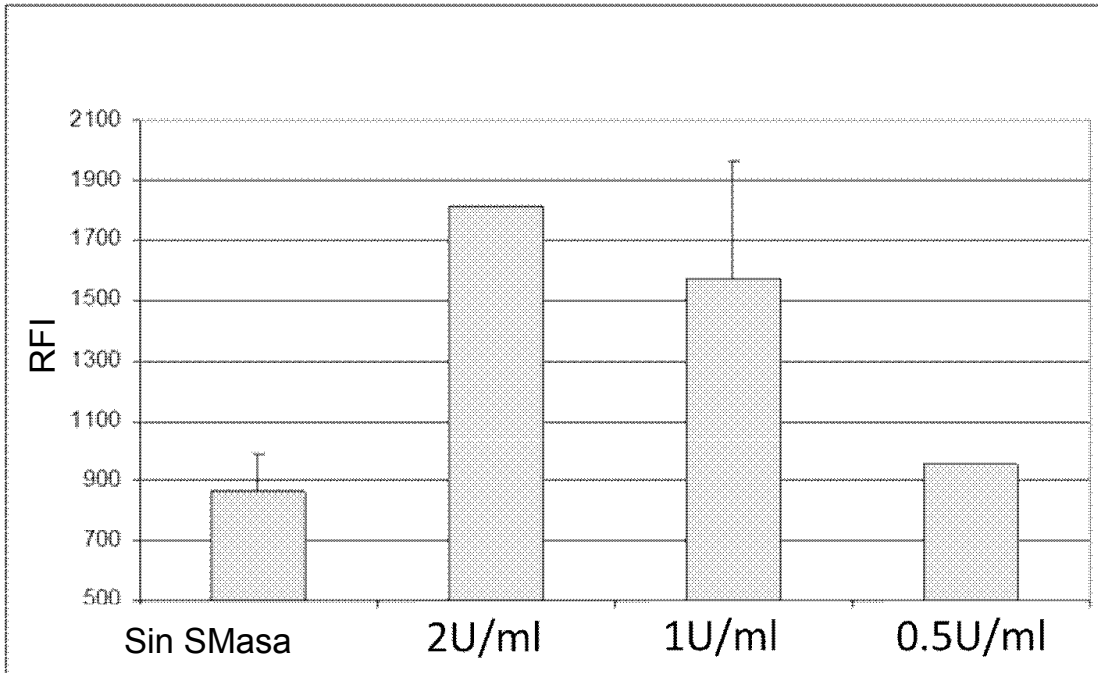


FIG. 4A

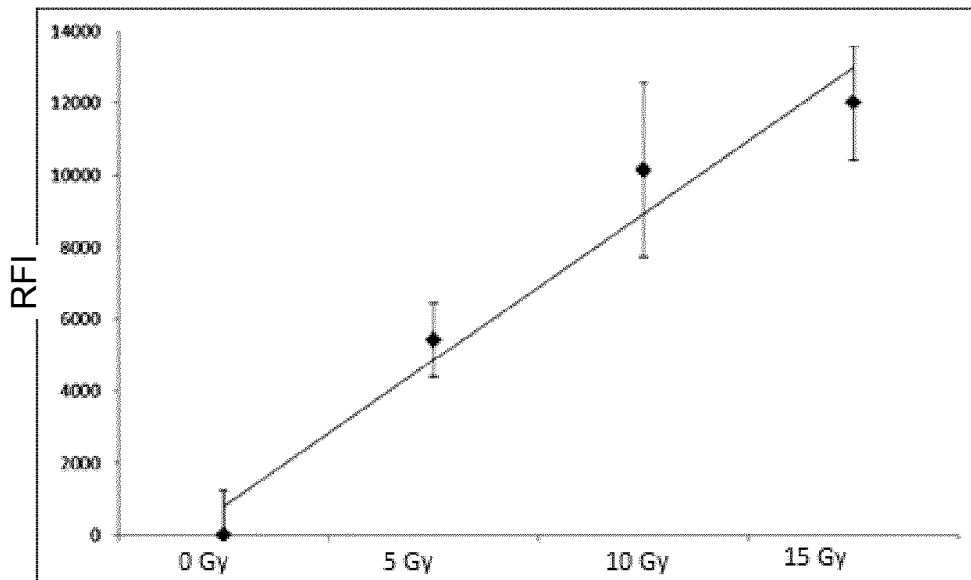


FIG. 4B

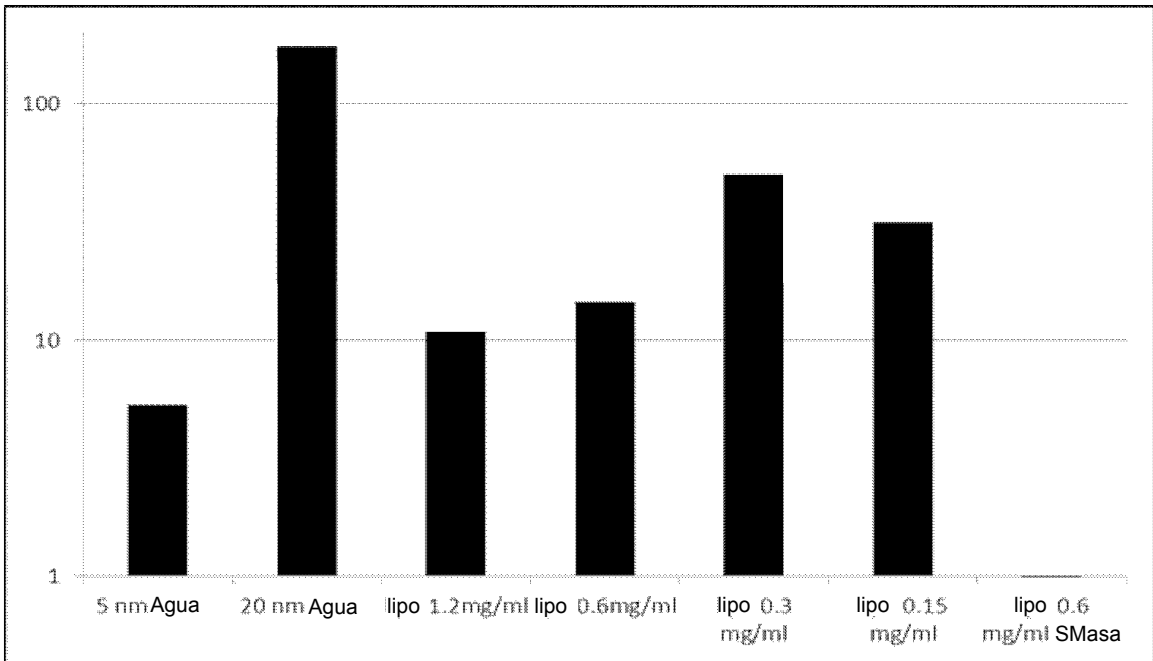


FIG. 5

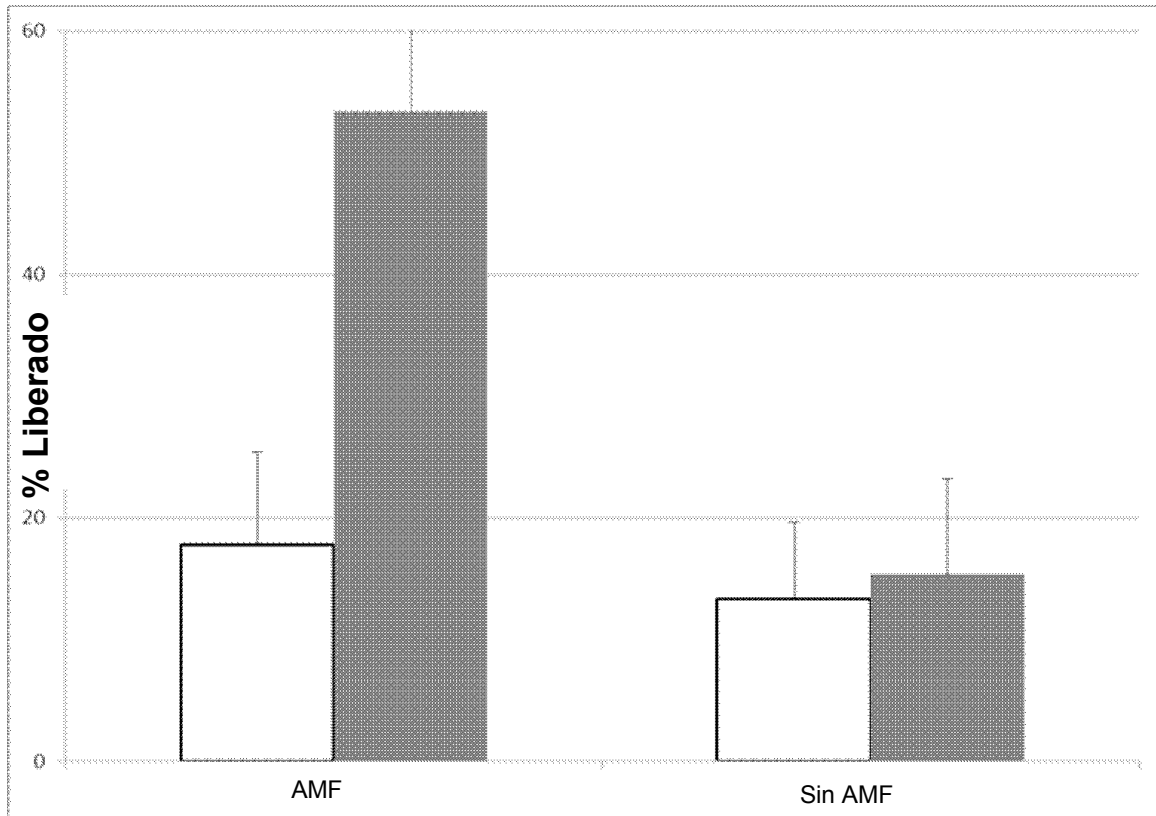


FIG. 6

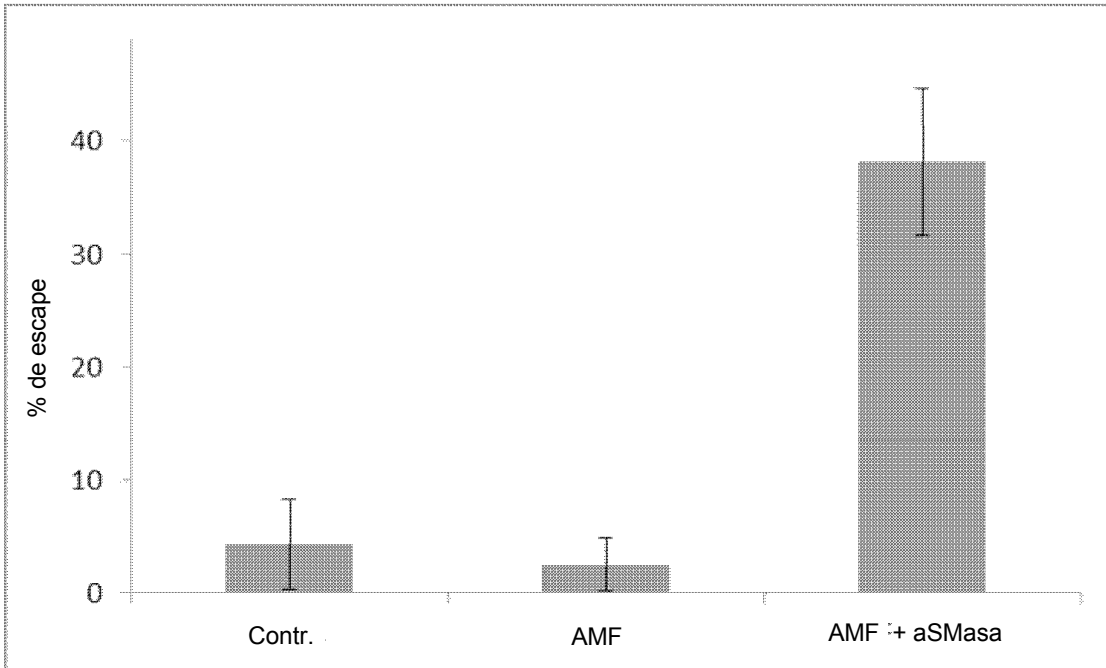


FIG. 7A

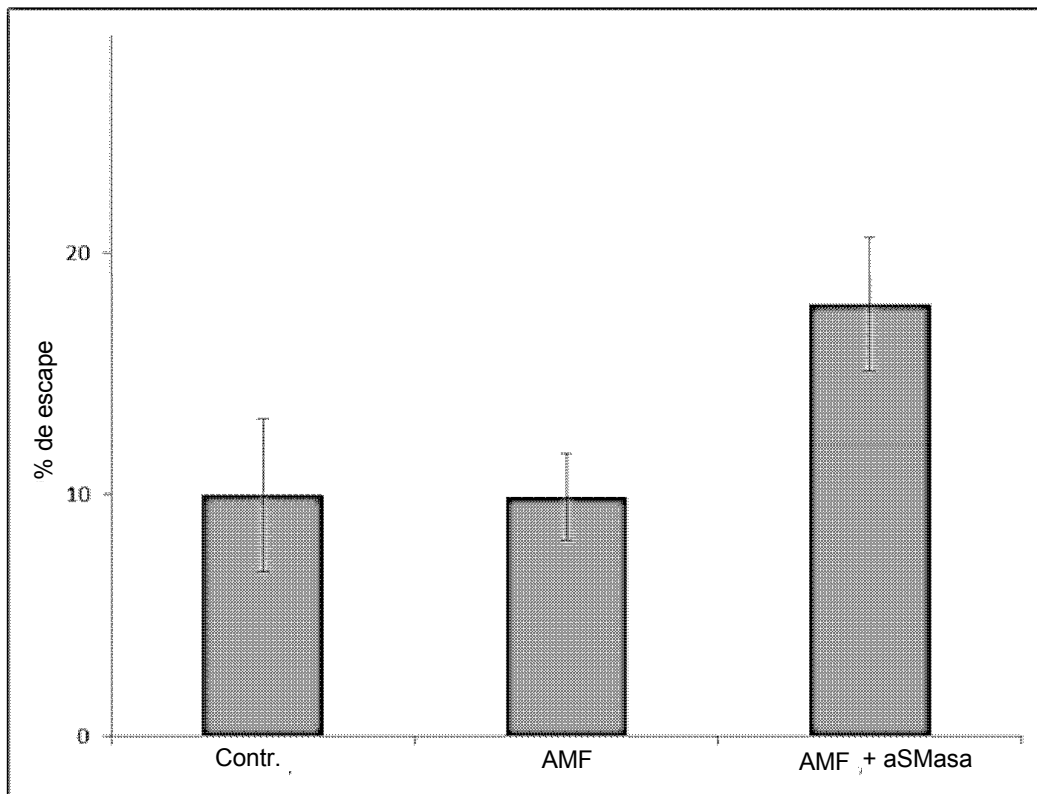


FIG. 7B

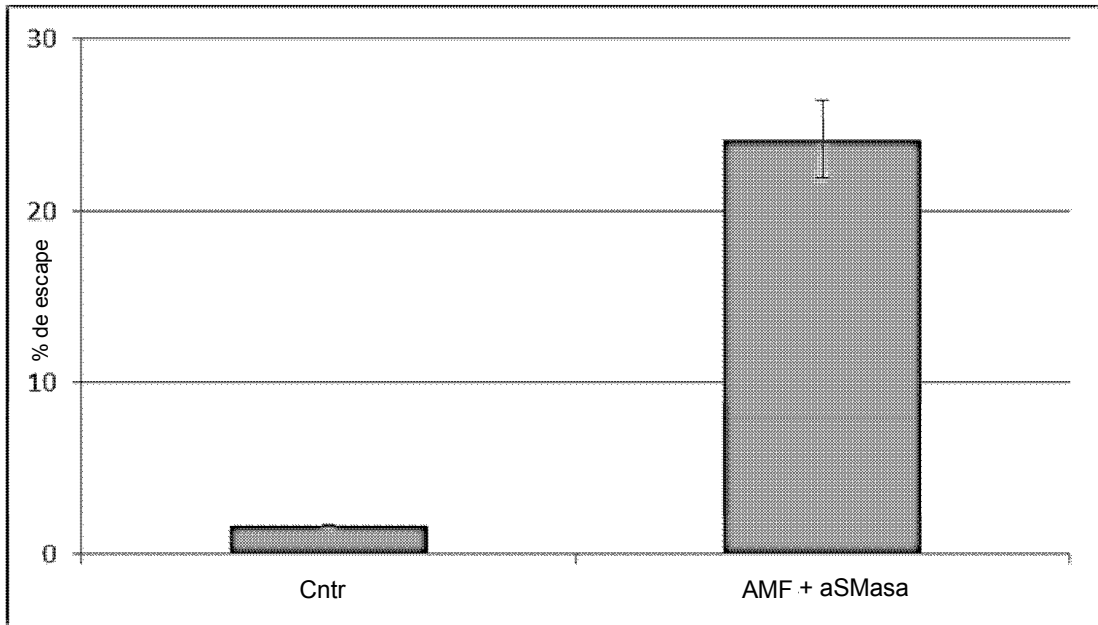


FIG. 7C

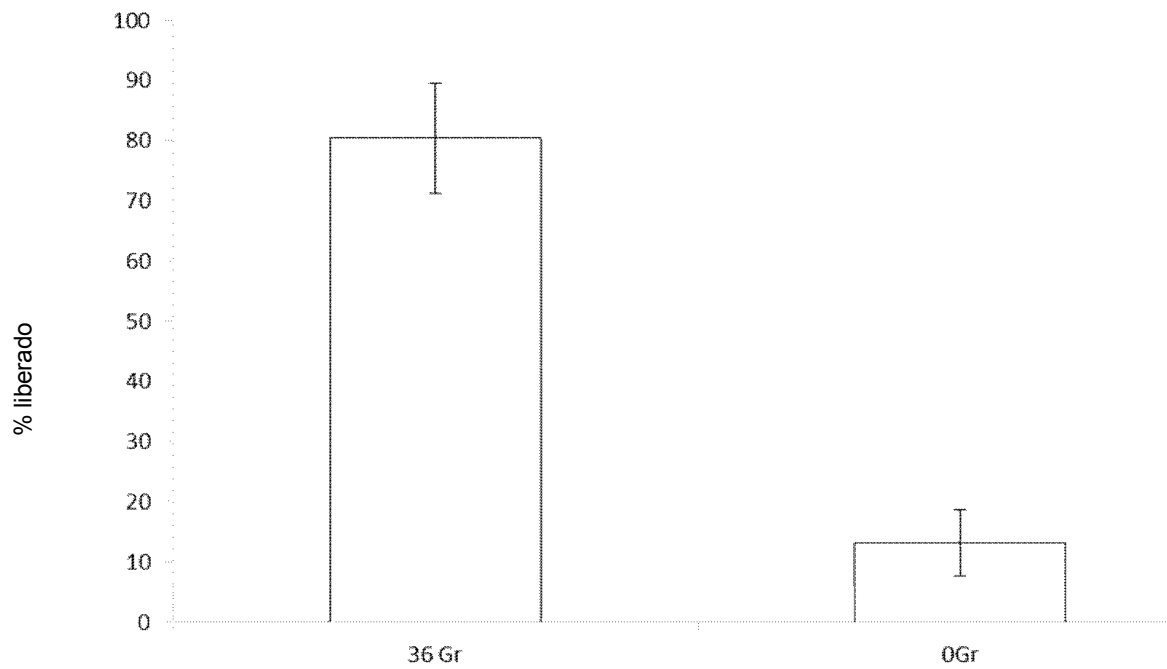


FIG. 7D

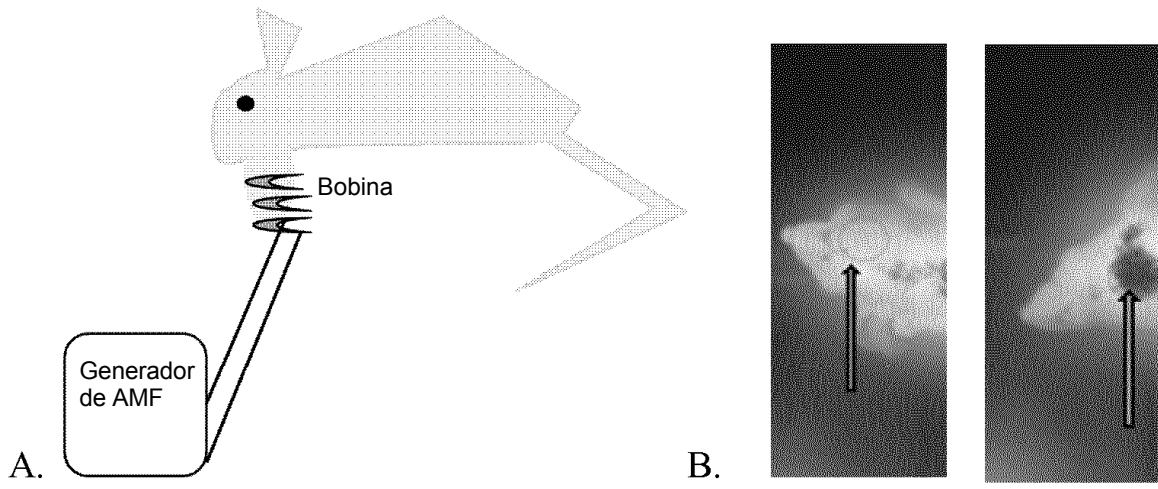


FIG. 8