

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 282**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)	A61K 31/07	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)	A61K 39/145	(2006.01)
A61K 38/02	(2006.01)	A61K 31/20	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 33/30	(2006.01)
A61K 31/7048	(2006.01)	A61K 33/26	(2006.01)
A61K 31/704	(2006.01)	A61K 33/00	(2006.01)
A61K 39/13	(2006.01)	A61K 36/54	(2006.01)
A61K 31/472	(2006.01)		
A61K 31/496	(2006.01)		
A61K 47/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/US2012/036576**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151517**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12779548 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2704688**

54 Título: **Composiciones de cocleato y métodos de elaboración y uso de las mismas**

30 Prioridad:

05.05.2011 US 201161482996 P
 13.09.2011 US 201161534075 P
 14.10.2011 US 201161547325 P
 13.12.2011 US 201161570067 P
 25.01.2012 US 201261590531 P
 08.03.2012 US 201261608272 P
 05.04.2012 US 201261620656 P
 23.04.2012 US 201261636793 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2020

73 Titular/es:

MATINAS BIOPHARMA NANOTECHNOLOGIES, INC. (50.0%)
1545 Route 206 South, Suite 302
Bedminster, NJ 07921, US y
RUTGERS, THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY (50.0%)

72 Inventor/es:

LU, RUYING y
MANNINO, RAPHAEL

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 741 282 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de cocleato y métodos de elaboración y uso de las mismas

5 **Antecedentes de la invención**

Los cocleatos son cristales de lípidos anhidros, estables y de múltiples capas que se forman espontáneamente tras la interacción de fosfatidilserina y calcio (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.078.052; 5.643.574; 5.840.707; 5.994.318; 6.153.217; 6.592.894, así como las publicaciones PCT n.ºs WO 2004/091572; WO 2004/091578; WO 2005/110361 y la publicación de patente estadounidense 2010/0178325. Las formulaciones de cocleato permanecen intactas en líquidos fisiológicos, incluyendo secreciones mucosas, plasma y líquido gastrointestinal, mediando así el suministro de compuestos biológicamente activos por muchas vías de administración, incluyendo oral, mucosa e intravenosa. De manera tradicional, tales formulaciones de cocleato se han limitado a la incorporación de principios activos farmacéuticos (API) hidrófobos, tal como anfotericina B (AmB). Por consiguiente, existe una gran necesidad en la técnica de proporcionar composiciones y métodos para la elaboración y el uso de composiciones de cocleato adecuadas para la encocleación estable y potenciada de API hidrófilos.

20 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que pueden elaborarse formulaciones de cocleato estables para encoclear moléculas biológicamente relevantes de interés y especialmente para potenciar la encocleación de moléculas biológicamente relevantes hidrófilas.

25 La presente invención proporciona una composición de cocleato que comprende una población de cocleatos, en la que los cocleatos comprenden: a) un primer lípido cargado negativamente; b) un catión, en la que el catión es un catión divalente seleccionado del grupo que consiste en cationes de calcio, zinc, bario y magnesio; c) un segundo lípido neutro; y d) una molécula biológicamente relevante, en la que la molécula biológicamente relevante es un aminoglucósido; en la que la razón del primer lípido cargado negativamente con respecto al segundo lípido neutro está entre 1:1 y 9:1; en la que el primer lípido cargado negativamente es fosfatidilserina y comprende al menos el 50% del lípido total; en la que el segundo lípido neutro es fosfatidilcolina o esfingomielina. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden tales composiciones de cocleato, métodos de elaboración de tales composiciones de cocleato y métodos de uso de tales composiciones de cocleato para aplicaciones terapéuticas.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra un esquema representativo de un esquema a modo de ejemplo para preparar formulaciones de cocleato.

40 Las figuras 2A-2B muestran los resultados de tratar macrófagos infectados por *M. avium* 101 (figura 2A) e infectados por *M. avium* 109 (Figura 2B) con preparaciones de cocleato de amikacina.

Las figuras 3A-3B muestran los resultados de eficacia *in vivo* de ratones C57/B16 infectados por *M. avium* 101 tratados con preparaciones de cocleato de amikacina orales (figura 3A) o intraperitoneales (figura 3B).

45 La figura 4 muestra un diagrama estructural de anfotericina B (AmB).

La figura 5 muestra una representación esquemática de una estrategia de fabricación para elaborar cocleatos de anfotericina B (CAMB).

50 La figura 6 muestra los resultados de tratar infección por *Candida* en macrófago *in vitro* usando CAMB y Fungizone (DAMB).

La figura 7 muestra un protocolo esquemático para evaluar la supervivencia y el análisis de carga tisular de infección por *Aspergillus* sistémica de ratones y posterior tratamiento con cocleatos de anfotericina B (CAMB) orales.

La figura 8 muestra los resultados de tratar ratones infectados con *Aspergillus f.* usando CAMB y DAMB.

60 La figura 9 muestra la carga tisular fúngica de *Aspergillus* en ratones infectados con *Aspergillus f.* y tratados con CAMB.

La figura 10 muestra los resultados de datos farmacocinéticos de CAMB de la administración a perros y humanos.

65 La figura 11 muestra títulos de anticuerpos séricos específicos contra la gripe que resultan de la administración oral o intramuscular de cocleatos de proteína de la gripe.

La figura 12 muestra el porcentaje de ratones sin niveles de virus de la gripe detectables que resultan de la administración oral de cocleatos de proteína de la gripe.

5 Las figuras 13A-13B muestran un diagrama esquemático de un proceso (figura 13A) y producto (figura 13B) de encocleación útil para potenciar la encocleación de moléculas hidrófilas.

La figura 14 muestra los resultados de cantidades de encocleación de API hidrófilo según diferentes composiciones lipídicas presentes dentro de los cocleatos presentados para encocleación del API.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que pueden elaborarse formulaciones de cocleato estables para encoclear moléculas biológicamente relevantes de interés y especialmente para potenciar la encocleación de moléculas biológicamente relevantes hidrófilas. En particular, fue sorprendente e inesperado que la adición de un
15 segundo lípido que tenía características definidas en el presente documento puede aumentar drásticamente la eficiencia con la que pueden encoclearse moléculas biológicamente relevantes.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

20 I. Definiciones

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un
25 elemento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “acilo” se refiere a un grupo carbonilo que está unido a través de su átomo de carbono a un hidrógeno (es decir, un formilo) o un grupo alifático (por ejemplo, acetilo), y similares.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “grupo alifático” incluye moléculas orgánicas caracterizadas por cadenas lineales o ramificadas, que tienen normalmente entre 1 y 24 átomos de carbono. En estructuras complejas, las cadenas pueden estar ramificadas, en puente o reticuladas. Los grupos alifáticos incluyen grupos alifáticos, grupos alqueno, grupos alquino, y cualquier combinación de los mismos.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “alquilo” se refiere a grupos químicos que incluyen hidrocarburos saturados que tienen uno o más átomos de carbono, por ejemplo, entre 1 y 24 átomos de carbono, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.) y grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, terc-butilo, sec-butilo, isobutilo, etc.). Debe entenderse que tanto grupos alquilo de cadena lineal como de cadena ramificada están abarcados por el término. En
40 determinadas realizaciones, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada puede tener 30 o menos átomos de carbono en su estructura principal, por ejemplo, C1-C30 para cadena lineal o C3-C30 para cadena ramificada. En determinadas realizaciones, un grupo alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada puede tener 20 o menos átomos de carbono en su estructura principal, por ejemplo, C1-C20 para cadena lineal o C3-C20 para cadena ramificada, y en más realizaciones particulares 18 o menos. Por ejemplo, el término “C4-C24” como en
45 “alquilo C4-C24” significa grupos alquilo que contienen de 4 a 24 átomos de carbono.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “alqueno”, “alquino” y “alqueno” se refieren a grupos alifáticos insaturados análogos a alquilos, pero que contienen al menos un doble o triple enlace carbono-carbono respectivamente.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “líquido corporal” se refiere a líquidos que se excretan o secretan del cuerpo así como líquidos que normalmente no (por ejemplo, líquido amniótico, humor acuoso, bilis, sangre y plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, cerumen y cera, líquido de Cowper o líquido preseminal, quilo, quimo, heces, eyaculación femenina, líquido intersticial, líquido intracelular, linfa, menstruación, leche materna, moco, líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, líquido sinovial, lágrimas, orina, lubricación vaginal, humor vítreo, vómito).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “cocleato”, “precipitado líquido” y “precipitado” se usan de manera intercambiable para referirse a un componente de precipitado líquido que incluye generalmente alternar
60 láminas de bicapa catiónica y lipídica con poco o ningún espacio acuoso interno, normalmente apiladas y/o enrolladas, en el que la lámina catiónica está compuesta por uno o más cationes multivalentes. De manera adicional, el término “encocleado” significa asociado con la estructura de cocleato, por ejemplo, mediante incorporación en la lámina catiónica y/o inclusión en la bicapa lipídica.

65 Tal como se usa en el presente documento “poner en contacto células” se define como exponer las células a una o más combinaciones de agentes descritos en el presente documento. En una realización, tales combinaciones

pueden administrarse a células, directa o indirectamente, usando medios locales, regionales o sistémicos.

El término “modular” incluye regulación por disminución y regulación por incremento. Los términos “regular por disminución”, “disminuir”, “reducir”, “inhibir”, y similares se usan todos en el presente documento para referirse generalmente a una disminución en una cantidad estadísticamente significativa. Los términos “regular por incremento”, “aumentar”, “potenciar”, y similares se usan todos en el presente documento para referirse generalmente a un aumento en una cantidad estadísticamente significativa. Por ejemplo, un aumento o una disminución puede ser de al menos aproximadamente el 10%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99%, el 100%, el 150%, el 200%, el 250%, el 300%, el 350%, el 400%, el 450%, el 500%, el 1000% o más o cualquier intervalo entre el 10-1000% inclusive en comparación con un control. En algunas realizaciones, el control puede ser un cambio en un estado celular tal como proliferación celular en presencia frente a ausencia de tratamiento. En otra realización, el control puede ser la actividad de un polipéptido de tipo natural de interés. Una “hiperactividad” o “nivel de actividad significativamente mayor” se refiere a un nivel de actividad de una molécula o muestra de prueba que es mayor que el error estándar del ensayo usado para evaluar la actividad, y es preferiblemente al menos el doble, y más preferiblemente tres, cuatro, cinco o diez o más veces la actividad en relación con una muestra de referencia o control y preferiblemente, la actividad promedio en varias muestras de control. El término “hipoactividad” se refiere a lo contrario de “hiperactividad.”

Tal como se usa en el presente documento, el término “catión multivalente” se refiere a un catión divalente o catión de valencia mayor, o cualquier compuesto que tiene al menos dos cargas positivas, incluyendo cationes minerales tales como calcio, bario, zinc, hierro y magnesio y otros elementos, tales como fármacos y otros compuestos, capaces de formar iones u otras estructuras que tienen múltiples cargas positivas capaces de quelar y asociar en puente lípidos cargados negativamente. De manera adicional o alternativamente, el catión multivalente puede incluir otros compuestos catiónicos multivalentes, por ejemplo, moléculas biológicamente relevantes catiónicas o protonizadas.

Tal como se usa en el presente documento, el término “protonizable” se refiere a una molécula que tiene la capacidad de ganar o más protones. Las moléculas protonizables pueden ser débilmente básicas, y pueden protonizarse mediante acidificación o adición de un protón. De manera adicional o alternativamente, las moléculas protonizables pueden ser neutras o débilmente ácidas y pueden protonizarse de la misma manera. Por tanto, las moléculas protonizables pueden ser aniónicas o neutras, que se vuelven catiónicas mediante protonización, o la molécula protonizable puede ser catiónica, y volverse más catiónica tras la protonización. Opcionalmente, el estado protonizado puede inducirse, por ejemplo, mediante acidificación u otros métodos, tal como se describe en el presente documento. La protonización vuelve la molécula catiónica o aumenta la valencia de una molécula biológicamente relevante que ya es catiónica, por ejemplo, de monovalente a divalente o trivalente. De manera similar, el término “protonización”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de aumentar la valencia de una molécula. “Protonizado” se refiere a una molécula biológicamente relevante que ha experimentado protonización. Por tanto, la valencia puede aumentarse, por ejemplo desde 0 hasta 1, desde 1 hasta 2, desde 2 hasta 3, desde 3 hasta 4, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, desde 0 hasta 3. Puede usarse cualquier método para aumentar la valencia, por ejemplo, aumentar el pH para protonizar una molécula. El término “débilmente básico” se refiere a moléculas que, a pH neutro, tienen la capacidad de aceptar protones. Es decir, las moléculas biológicamente relevantes débilmente básicas son capaces de volverse catiónicas o más catiónicas mediante protonización. Como tal, las moléculas débilmente básicas pueden ser aniónicas o neutras, y volverse catiónicas mediante protonización. Alternativamente, las moléculas débilmente básicas pueden ser catiónicas, y pueden volverse más catiónicas, es decir, policatiónicas, mediante protonización. En cambio, las moléculas “débilmente ácidas”, a pH neutro, tienen la capacidad de dar protones. Las moléculas “débilmente ácidas protonizables”, debido a su débil acidez, tienen la capacidad de aceptar protones a pH disminuido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula biológica relevante”, se refiere a una molécula que va a encodarse, y generalmente no se refiere al lípido e ión usados para precipitar el cocleato. Las moléculas biológicamente relevantes incluyen cualquier compuesto que tiene una propiedad de interés biológico, por ejemplo, las que tienen un papel en los procesos vitales de un organismo vivo. Una molécula biológicamente relevante puede ser orgánica o inorgánica, un monómero o un polímero, endógena a un organismo huésped o no, que se produce de manera natural o se sintetiza *in vitro* y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “supervivencia” incluye todo de lo siguiente: supervivencia hasta mortalidad, también conocida como supervivencia global (en la que dicha mortalidad puede ser o bien independiente de la causa o bien relacionada con tumor); “supervivencia libre de recidiva” (en la que el término recidiva incluirá tanto recidiva localizada como distante); supervivencia libre de metástasis; supervivencia libre de enfermedad (en la que el término enfermedad incluirá cáncer y enfermedades asociadas con el mismo). La duración de dicha supervivencia puede calcularse por referencia a un punto de partida definido (por ejemplo, tiempo de diagnóstico o inicio de tratamiento) y criterio de valoración (por ejemplo, muerte, recidiva o metástasis). Además, pueden ampliarse los criterios de eficacia del tratamiento para incluir respuesta a quimioterapia, probabilidad de supervivencia, probabilidad de metástasis dentro de un periodo de tiempo dado, y probabilidad de recidiva de tumor.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” significará cualquier animal que incluye, sin limitación, un humano, un ratón, una rata, un conejo, un primate no humano o cualquier otro mamífero. En una realización, el sujeto es un primate. En otra realización, el sujeto es un humano.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “sinérgico” se refiere a una combinación de agentes terapéuticos descrita en el presente documento, que, cuando se toman juntos, es más eficaz que los efectos aditivos de las terapias individuales. Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes terapéuticos) permite el uso de menores dosis de uno o más del/de los agente(s) terapéutico(s) y/o administración menos frecuente del/de los agente(s) a un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo. La capacidad de utilizar la bajada de la dosis de uno o más agentes terapéuticos y/o administrar el agente terapéutico con menor frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración del agente a un sujeto sin reducir la eficacia de la terapia en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado eficacia mejorada de agentes en la prevención, gestión o tratamiento de una enfermedad o trastorno, por ejemplo un trastorno proliferativo. Finalmente, un efecto sinérgico de una combinación de terapias puede evitar o reducir efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier agente terapéutico solo. Tal como se usa en el presente documento, el término “en combinación” se refiere al uso de más de un agente terapéutico. El uso del término “en combinación” no limita el orden en el que los agentes terapéuticos se administran a un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo. Un primer agente terapéutico, tal como un compuesto descrito en el presente documento, puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), de manera concomitante con o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) la administración de un segundo agente terapéutico, tal como una composición de cocleato de aminoglicósido, a un sujeto con una enfermedad o trastorno.

Un “polinucleótido transcrito” o “transcrito de nucleótido” es un polinucleótido (por ejemplo, un ARNm, ARNhn, un ADNc, o un análogo de tal ARN o ADNc) que es complementario a u homólogo con toda o una porción de un ARNm maduro elaborado mediante transcripción de un marcador de la divulgación y procesamiento postranscripcional normal (por ejemplo, corte y empalme), si lo hubiera, del transcrito de ARN, y transcripción inversa del transcrito de ARN.

Existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar para la proteína, tal como se define por el código genético (mostrado a continuación). Asimismo, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por ese ácido nucleico, tal como se define por el código genético.

40 CÓDIGO GENÉTICO

Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidina (His, H)	CAC, CAT
Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
Metionina (Met, M)	ATG
Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
Triptófano (Trp, W)	TGG

Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
Señal de terminación (fin)	TAA, TAG, TGA

Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, mediante la cual, para la mayoría de los aminoácidos usados para elaborar proteínas, puede usarse más de un triplete de nucleótidos codificantes (ilustrado anteriormente). Por tanto, varias secuencias de nucleótidos diferentes pueden codificar para una secuencia de aminoácidos dada. Tales secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes dado que dan como resultado la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque determinados organismos pueden traducir algunas secuencias de manera más eficaz de lo que traducen otras). Además, ocasionalmente, puede encontrarse una variante metilada de una purina o pirimidina en una secuencia de nucleótidos dada. Tales metilaciones no afectan a la relación codificante entre el codón de trinucleótidos y el correspondiente aminoácido.

En vista de lo anterior, la secuencia de nucleótidos de un ADN o ARN que codifica para un polipéptido o proteína de fusión de la divulgación o cualquier porción del mismo puede usarse para derivar la secuencia de aminoácidos de polipéptido o proteína de fusión, usando el código genético para traducir el ADN o ARN en una secuencia de aminoácidos. Asimismo, para la secuencia de aminoácidos de polipéptido o proteína de fusión, pueden deducirse secuencias de nucleótidos correspondientes que pueden codificar para el polipéptido o proteína de fusión a partir del código genético (que, debido a su redundancia, producirá múltiples secuencias de ácido nucleico para cualquier secuencia de aminoácidos dada). Por tanto, la descripción y/o divulgación en el presente documento de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido o proteína de fusión debe considerarse que incluye también la descripción y/o divulgación de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos. De manera similar, la descripción y/o divulgación de una secuencia de aminoácidos de polipéptido o proteína de fusión en el presente documento debe considerarse que incluye también la descripción y/o divulgación de todas las posibles secuencias de nucleótidos que pueden codificar para la secuencia de aminoácidos.

II. Composiciones de cocleato

A. Cocleatos

Se han divulgado cocleatos y métodos para la elaboración y el uso de los mismos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.078.052; 5.643.574; 5.840.707; 5.994.318; 6.153.217; 6.592.894, así como las publicaciones PCT n.ºs WO 2004/091572; WO 2004/091578; WO 2005/110361 y la publicación de patente estadounidense 2010/0178325. Los vehículos de suministro de cocleato son precipitados estables de lípido-catión que pueden componerse de materiales simples que se producen de manera natural, por ejemplo, fosfatidilserina y calcio. Pueden utilizarse mezclas de moléculas que se producen de manera natural (por ejemplo, lípidos de soja) y/o lípidos sintéticos o modificados.

La estructura de cocleato proporciona protección contra la degradación de moléculas "encocleadas" asociadas. Las concentraciones de cationes divalentes *in vivo* en suero y secreciones mucosas son tales que la estructura de cocleato se mantiene. Por tanto, la mayoría de moléculas asociadas a cocleato, por ejemplo, moléculas biológicamente relevantes, están presentes en las capas internas de una estructura principalmente sólida, no acuosa, estable, impermeable. Puesto que la estructura de cocleato incluye una serie de capas sólidas, los componentes dentro del interior de la estructura de cocleato permanecen sustancialmente intactos, aunque las capas exteriores del cocleato pueden exponerse a enzimas o condiciones ambientales adversas.

El interior del cocleato está principalmente libre de agua y es resistente a la penetración por el oxígeno. El oxígeno y el agua son principalmente responsables de la descomposición y degradación de moléculas que puede conducir a vida útil de almacenamiento reducida. Por consiguiente, la encocleación también puede conceder estabilidad de vida útil de almacenamiento extensa a moléculas biológicamente relevantes encocleadas.

Con respecto al almacenamiento, los cocleatos pueden almacenarse en tampón que contiene cationes, o liofilizarse o de otro modo convertirse en un polvo, y almacenarse a temperatura ambiente. Si se desea, los cocleatos también pueden reconstituirse con líquido antes de la administración. Las preparaciones de cocleato han demostrado ser estables durante más de dos años a 4°C en un tampón que contiene cationes, y al menos un año como un polvo liofilizado a temperatura ambiente.

En una realización, el cocleato comprende a) un componente lipídico cargado negativamente, b) un componente de catión divalente, y c) un segundo lípido neutro que interactúa con el catión.

Los cocleatos pueden prepararse fácilmente a partir de sustancias seguras, simples, bien definidas, que se producen de manera natural, por ejemplo, PS y calcio. También pueden utilizarse mezclas de lípidos que se producen de manera natural (por ejemplo, lípidos de soja), lípidos sintéticos y/o lípidos modificados. La

fosfatidilserina es un componente natural de todas las membranas biológicas, y se concentra más en el cerebro. Los fosfolípidos usados pueden producirse de manera sintética, o prepararse a partir de fuentes naturales. La PS de soja es asequible, está disponible en grandes cantidades y es adecuada para su uso en humanos. Los ensayos clínicos indican que PS es segura y puede desempeñar un papel en el soporte de las funciones mentales en el cerebro que envejece. Al contrario que muchos lípidos catiónicos, los cocleatos (que se componen al menos parcialmente de lípidos aniónicos) son no inflamatorios y biodegradables. Se ha evaluado la tolerancia *in vivo* de ratones a múltiples administraciones de cocleatos por diversas vías, incluyendo intravenosa, intraperitoneal, intranasal y oral. Múltiples administraciones de dosis elevadas de formulaciones de cocleato al mismo animal no muestran toxicidad, y no dan como resultado o bien el desarrollo de una respuesta inmunitaria a la matriz de cocleato, o bien cualquier efecto secundario en relación con el vehículo de cocleato.

Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos neutros" incluye cualquiera de varias especies lipídicas que existen o bien en una forma no cargada o bien zwitteriónica neutra a pH fisiológico y, por tanto, se incluyen dentro del grupo de lípidos que carece de una función aniónica. Tales lípidos incluyen, por ejemplo diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, dihidroesfingomielina, cefalina y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros para su uso en las composiciones de cocleato descritas en el presente documento está guiada generalmente por la consideración de, por ejemplo, tamaño y estabilidad de cocleato. Los lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de longitud de cadena y grado de saturación variables están disponibles o pueden aislarse o sintetizarse mediante técnicas bien conocidas. En un grupo de realizaciones, pueden usarse lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C14 a C22. En otro grupo de realizaciones, pueden usarse lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C14 a C22. Además, pueden usarse lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados o insaturados. En algunas realizaciones, los lípidos neutros usados en la invención son DSPC, DPPC, POPC, o cualquier fosfatidilcolina relacionada. Los lípidos neutros útiles en la invención también pueden componerse de esfingomielina, dihidroesfingomielina, o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, tales como serina e inositol.

Se indica que los lípidos neutros netos pueden, no obstante, contener grupos de cabeza que contienen una funcionalidad aniónica (es decir, capaces de interactuar de manera iónica con cationes). Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que las moléculas hidrófilas o moléculas grandes con dominios hidrófilos, tales como principios activos farmacéuticos (API) de interés, pueden formularse en forma cocleada de manera potenciada inesperadamente asociando el API con un dominio lipídico que actúa como "balsa" que permanece intacta e incrustada dentro de la matriz cristalina de cocleato.

En otras realizaciones de la divulgación, "lípidos anfífilicos" o "lípidos anfipáticos" son útiles para las composiciones de cocleato descritas en el presente documento y se refieren a cualquier material adecuado, en las que la porción hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. En una realización, las moléculas anfífilicas tienen un grupo polar soluble en agua unido a una cadena de hidrocarburo insoluble en agua. Se incluyen lípidos anfífilicos con el grupo de lípidos que carece de una función aniónica. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos representativos incluyen esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) o dilinoleoilfosfatidilcolina. También pueden usarse otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glucoesfingolípidos, diacilgliceroles y beta-aciloxiácidos. Además, tales lípidos anfífilicos pueden mezclarse fácilmente con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides. El componente de esteroles de la mezcla lipídica, cuando está presente, puede ser cualquiera de los esteroides usados convencionalmente en el campo de preparación de partículas lipídicas, vesículas lipídicas o liposomas. En una realización, el esteroles es colesterol.

Algunos lípidos anfífilicos son lípidos cargados negativamente que pueden usarse en la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos cargados negativamente" incluye lípidos que tienen un grupo de cabeza que porta una carga negativa formal en disolución acuosa a un pH ácido, básico o fisiológico, y también incluye lípidos que tienen un grupo de cabeza zwitteriónico. Los lípidos aniónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilserina (PS), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), diacilfosfatidilserina.

Otros lípidos anfífilicos son lípidos cargados positivamente que pueden tener funcionalidad catiónica (es decir, la capacidad de interactuar de manera iónica con aniones). Los lípidos catiónicos a modo de ejemplo, que portan una carga positiva neta a pH aproximadamente fisiológico, incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-distearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal cloruro de 1,2-dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP. Cl"), 3.beta.-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(espermincarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"), dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolanina ("DOPE"), 1,2-dioleil-3-dimetilamonioopropano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA") y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio ("DMRIE"). Además, pueden usarse varias

preparaciones de lípidos catiónicos comerciales, tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN (incluyendo DOTMA y DOPE, disponibles de GIBCO/BRL), y LIPOFECTAMINE (que comprende DOSPA y DOPE, disponible de GIBCO/BRL). En algunas realizaciones, un lípido catiónico puede ser un aminolípido.

5 El lípido es una mezcla de lípidos, en el que el lípido cargado negativamente, en el que el primer lípido cargado negativamente es fosfatidilserina, comprende al menos el 50% del lípido total. La razón del lípido cargado negativamente con respecto a un segundo lípido neutro, en el que el segundo lípido neutro es fosfatidilcolina, está entre 1:1 y 9:1.

10 Los lípidos usados en el presente documento pueden incluir lípidos basados en soja. En algunas realizaciones, el lípido incluye fosfolípidos, tales como fosfolípidos basados en soja. Los lípidos pueden ser naturales o sintéticos. Por ejemplo, el lípido puede incluir cadenas acilo de ácido graso esterificado, o cadenas orgánicas unidas por uniones no éster tales como uniones éter (tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.956.159), uniones disulfuro, y sus análogos.

15 En una realización las cadenas lipídicas son desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 26 átomos de carbono, y las cadenas lipídicas pueden ser saturadas o insaturadas. Las cadenas de lípido de acilo graso útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido n-tetradecanoico, ácido n-hexadecanoico, ácido n-octadecanoico, ácido n-eicosanoico, ácido n-docosanoico, ácido n-tetracosanoico, ácido n-hexacosanoico, ácido cis-9-hexadecenoico, ácido cis-9-octadecenoico, ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico, ácido todo-cis-9,12,15-octadecatrienoico, ácido todo-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico, ácido todo-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, ácido 2,4,6,8-tetrametildecanoico, y ácido lactobacílico, y similares.

20 Las composiciones de cocleato de la presente invención pueden incluir además compuestos adicionales que se sabe que se usan en preparaciones lipídicas, por ejemplo, lípido pegilado. El lípido pegilado incluye lípidos unidos de manera covalente a polímeros de polietilenglicol (PEG). Los PEG se clasifican de manera convencional por su peso molecular, por tanto PEG 6.000 MW, por ejemplo, tiene un peso molecular de aproximadamente 6000. Añadir lípido pegilado dará como resultado generalmente un aumento de la cantidad de compuesto (por ejemplo, péptido, nucleótido y nutriente) que puede incorporarse en el cocleato. Un lípido pegilado a modo de ejemplo es dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) que alberga PEG 5.000 MW.

B. Moléculas biológicamente relevantes

35 Los cocleatos de la presente invención se asocian o "cargan" con una molécula biológicamente relevante, en la que la molécula biológicamente relevante es un aminoglucósido. Una "molécula biológicamente relevante" es una molécula que va a encoclearse, y generalmente no se refiere al lípido e ión usados para precipitar el cocleato. Las moléculas biológicamente relevantes incluyen cualquier compuesto que tiene una propiedad de interés biológico, por ejemplo, los que tienen un papel en los procesos vitales de un organismo vivo. Una molécula biológicamente relevante puede ser orgánica o inorgánica, un monómero o un polímero, endógena a un organismo huésped o no, que se produce de manera natural o se sintetiza *in vitro* y similares.

40 Los ejemplos no limitativos de moléculas biológicamente relevantes incluyen vitaminas, minerales, nutrientes, micronutrientes, aminoácidos, toxinas, microbicidas, bacteriostático, cofactores, enzimas, polipéptidos, agregados de polipéptido, polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono, nucleótidos, almidones, pigmentos, ácidos grasos, ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados, aromatizantes, aceites esenciales, extractos, hormonas, citocinas, virus, orgánulos, esteroides y otras estructuras de anillo múltiple, sacáridos, metales, venenos metabólicos, antígenos, agentes de obtención de imágenes, porfirinas, pigmentos tetrapirrólicos, fármacos y similares.

50 La molécula biológicamente relevante puede ser un agente de diagnóstico, tal como un agente de obtención de imágenes. Los agentes de obtención de imágenes incluyen agentes nucleares y sondas fluorescentes, por ejemplo, porfirinas. Las porfirinas incluyen pigmentos o agentes tetrapirrólicos. Un agente tetrapirrólico de este tipo es tetrafenilporfirina de zinc (ZnTPP), que es una molécula hidrófoba, fluorescente que tiene alta absorción en el espectro visible (morado oscuro).

55 El polinucleótido puede ser uno que se expresa para dar un polipéptido o polinucleótido biológicamente activo. Por tanto, el polipéptido puede servir como inmunógeno o, por ejemplo, tener actividad enzimática. El polinucleótido puede tener actividad catalítica, por ejemplo, ser un ribosoma, o puede servir como inhibidor de la transcripción o traducción, por ejemplo, un ARN pequeño de interferencia (ARNip) o una molécula antisentido. El polinucleótido puede ser una molécula antisentido incluyendo molécula antisentido modificada, tal como una molécula antisentido de morfolino. El polinucleótido puede modificarse, por ejemplo, puede sintetizarse para tener una estructura principal de morfolino. Si se expresa, el polinucleótido incluye preferiblemente los elementos reguladores necesarios, tales como un promotor, tal como se conoce en la técnica. Un ejemplo específico de un polipéptido es insulina.

65 La molécula biológicamente relevante puede ser una molécula orgánica que es hidrófoba en medios acuosos. La molécula biológicamente relevante también puede ser una molécula catiónica monovalente o polivalente soluble en

agua, aniónica o neutra neta a pH fisiológico.

El fármaco puede ser, pero no se limita a, una proteína, un péptido pequeño, un polinucleótido bioactivo, un antibiótico, un antiviral, un anestésico, antipsicótico, un antiinfeccioso, un antifúngico, un anticancerígeno, un inmunodepresor, un inmunoestimulante, un antiinflamatorio esteroideo, un antiinflamatorio no esteroideo, un antioxidante, un antidepresivo que puede derivarse de manera sintética o natural, una sustancia que apoya o potencia la función mental o inhibe el deterioro mental, un anticonvulsivo, un inhibidor de la proteasa VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleófilo, una citocina, un tranquilizante, un agente mucolítico, un dilatador, un vasoconstrictor, un descongestivo, un inhibidor de leucotrieno, un anticolinérgico, un antihistamínico, un agente modulador del metabolismo de lípidos de colesterol o un agente vasodilatador. El fármaco también puede ser cualquier medicamento de venta libre (sin receta).

Un fármaco antifúngico puede ser un macrólido de polieno, macrólido de tetraeno, macrólido pentaénico, pirimidina fluorada, imidazol, azol, triazol, éter fenólico halogenado, tiocarbamato, alilamina, inhibidor de esterol, y un agente que interpola componentes de la pared celular fúngica.

Se usan normalmente fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para tratar la inflamación, las distensiones musculares y la fiebre alta. Los AINE funcionan inhibiendo la ciclooxigenasa-1 (COX1) y la ciclooxigenasa-2 (COX2). Las enzimas COX1 son responsables de proteger el revestimiento del estómago y las enzimas COX2 son responsables de la producción de prostaglandinas, que son importantes en el proceso inflamatorio. Por desgracia, las preparaciones comercialmente disponibles de AINE son activas tanto contra COX1 como COX2, y por tanto tienen efectos secundarios no deseados tales como úlceras, estómago revuelto o náuseas.

Los ejemplos de fármacos adecuados incluyen anfotericina B, aciclovir, adriamicina, carbamazepina, ivermectina, melfalán, nifedipina, indometacina, curcumina, aspirina, ibuprofeno, naproxeno, acetaminofeno, rofecoxib, diclofenaco, ketoprofeno, meloxicam, nabumetona, estrógenos, testosteronas, esteroides, fenitoína, ergotaminas, cannabinoides, rapamicina, propanadid, propofol, alfadiona, equinomicina, miconazol, nitrato de miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, griseofulvina, clotrimazol, econazol, terconazol, butoconazol, oxiconazol, sulconazol, saperconazol, voriconazol, ciclopirox olamina, haloprogina, tolnaftato, naftifina, clorhidrato de terbinafina, morfolinis, flucitosina, natamicina, butenafina, ácido undecilénico, pomada de Whitefield, ácido propiónico, ácido caprílico, clioquinol, sulfuro de selenio, tenipósido, hexametilmelamina, Taxol, Taxotere, 18-hidroxidesoxicorticosterona, prednisolona, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, piroxicam, diazepam, verapamilo, vancomicina, tobramicina, teicoplanina, bleomicina, peptidoglicano, ristocetina, sialoglucoproteínas, orienticina, avaporcina, helevecardina, galacardina, actinoidina, gentamicina, netilmicina, amikacina, kanamicina A, kanamicina B, neomicina, paromomicina, neamina, estreptomycinina, dihidroestreptomycinina, apramicina, ribostamicina, espectinomycinina, caspofungina, equinocandina B, aculeacina A, micafungina, anidulafungina, cilofungina, pneumocandina, geldanamycinina, nistatina, Rifampin, tirfostina, un inhibidor de la síntesis de glucanos, ácido de vitamina A, mesalamina, risedronato, nitrofurantoína, dantroleno, etidronato, nicotina, amitriptilina, clomipramina, citalopram, dotiepinina, doxepina, fluoxetina, imipramina, lofepramina, mirtazapina, nortriptilina, paroxetina, reboxetina, sertralina, trazodona, venlafaxina, dopamina, hierba de San Juan, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, amastatina, antipaína, bestatina, benzamidina, quimostatina, 3,4-dicloroisocoumarina, elastatinal, leupeptina, pepstatina, 1,10-fenantrolina, fosforamidón, etosuximida, etotoína, felbamato, fosfenitoína, lamotrigina, levitiracetam, mefenitoína, metsuximida, oxcabazepina, fenobarbital, fenusuximida, primidona, topiramato, trimetadiona, zonisamida, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir y amprenavir.

El fármaco puede ser un polipéptido tal como ciclosporina, angiotensina I, II y III, encefalinas y sus análogos, ACTH, péptidos antiinflamatorios I, II, III, bradixinina, calcitonina, b-endorfina, dinorfina, leucocinina, hormona liberadora de la hormona leutinizante (LHRH), insulina, neurocininas, somatostatina, sustancia P, hormona liberadora de la tiroides (TRH) y vasopresina.

El fármaco puede ser un antígeno, pero no se limita a un antígeno de proteína. El antígeno también puede ser un hidrato de carbono o ADN. Los ejemplos de proteínas antigénicas incluyen proteínas de membrana, hidratos de carbono, glucoproteínas de la envoltura de virus, proteínas de células animales, proteínas de células vegetales, proteínas bacterianas y proteínas parasitarias.

El antígeno puede extraerse de la partícula, célula, tejido u organismo fuente mediante métodos conocidos. No es necesario mantener la actividad biológica del antígeno. Sin embargo, en algunos casos (por ejemplo, cuando una proteína tiene actividad de unión a ligando o fusión de membrana o una conformación compleja que se reconoce por el sistema inmunitario), es deseable mantener la actividad biológica. En estos casos, se usa un tampón de extracción que contiene un detergente que no destruye la actividad biológica de la proteína de membrana. Los detergentes adecuados incluyen detergentes iónicos tales como sales de colato, sales de desoxicolato y similares o detergentes de polioxietileno heterogéneos tales como Tween, BRIG o Triton.

La utilización de este método permite la reconstitución de antígenos en los liposomas con retención de actividades biológicas, y asociación eficaz con los cocleatos. El método también puede usarse sin sonicación, pH, temperatura o presión extremos todos los cuales pueden tener un efecto adverso tras la reconstitución eficiente del antígeno en

una forma biológicamente activa.

Los nutrientes adecuados incluyen, pero no se limitan a licopeno, micronutrientes tales como fitoquímicos o zooquímicos, vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos, aceites de pescado, extractos de aceite de pescado, sacáridos, productos herbarios y aceites esenciales y agentes de aroma. Los ejemplos específicos incluyen vitaminas A, B, B1, B2, B3, B12, B6, complejo B, C, D, E y K, precursores de vitaminas, carotenoides, y beta-caroteno, resveratrol, biotina, colina, inositol, ginkgo, luteína, zeaxantina, quercetina, silibinina, alcohol perillíco, genisteína, sulfurofano, y ácidos grasos esenciales, incluyendo ácido eicosapentaenoico (EPA), ácidos grasos gamma-3, omega-3, gamma-6 y omega-6, hierbas, especias y hierro. Los minerales incluyen, pero no se limitan a boro, cromo, minerales coloidales, plata coloidal, cobre, manganeso, potasio, selenio, vanadio, sulfato de vanadilo, calcio, magnesio, bario, hierro y zinc.

Tal como se usa en el presente documento, "micronutriente" es un nutriente que el cuerpo debe obtener de fuentes externas. Generalmente, los micronutrientes son esenciales para el cuerpo en pequeñas cantidades.

La molécula biológicamente relevante puede ser un sacárido o edulcorante, por ejemplo, sacarina, isomaltitol, maltodextrina, aspartamo, glucosa, maltosa, dextrosa, fructosa y sacarosa. Los agentes de aroma incluyen aceites, aceites esenciales, o extractos, incluyendo pero sin limitarse a aceites y extractos de canela, vainilla, almendra, menta piperita, hierbabuena, camomila, geranio, jengibre, pomelo, hisopo, jazmín, lavanda, limón, limoncillo, marjorana, lima, nuez moscada, naranja, romero, salvia, rosa, tomillo, anís, albahaca, pimienta negra, té o extractos de té, una hierba, un cítrico, una especia o una semilla.

En algunas realizaciones, la molécula biológicamente relevante puede ser una molécula biológicamente relevante protonizada. En una realización, la molécula biológicamente relevante es una molécula biológicamente relevante débilmente básica protonizada. La farmacocinética de moléculas biológicamente relevantes débilmente básicas (por ejemplo, vancomicina y tobramicina), ha sido dominada convencionalmente por su mala solubilidad en lípidos tales como la leche. Además, las moléculas biológicamente relevantes adecuadas para su uso según la presente invención pueden incluir moléculas biológicamente relevantes débilmente ácidas protonizadas o moléculas biológicamente relevantes anfotéricas protonizadas. Las moléculas biológicamente relevantes débilmente ácidas o moléculas biológicamente relevantes anfotéricas pueden o no incluir una carga positiva inicial. Tales moléculas biológicamente relevantes también se volverían catiónicas mediante protonización. Las moléculas biológicamente relevantes protonizables pueden estar cargadas negativamente, cargadas positivamente, no cargadas o ser zwitteriónicas. En una realización, la molécula biológicamente relevante protonizada es monovalente. En otras realizaciones, la molécula biológicamente relevante protonizada es multivalente, por ejemplo, divalente, trivalente, etc. En determinadas realizaciones, puede ser preferible una valencia mayor debido al tamaño y/o la conformación de la molécula biológicamente relevante. En una realización, la molécula biológicamente relevante protonizada es un péptido protonizado, tal como una proteína protonizada. En otra realización, la molécula biológicamente relevante protonizada es un nucleótido protonizado. El nucleótido protonizado puede ser, pero no se limita a un ADN protonizado, un ARN protonizado, un morfolino protonizado, una molécula de ARNip protonizado, una ribozima protonizada, una molécula antisentido protonizada o un plásmido protonizado.

La molécula biológicamente relevante es un aminoglucósido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoglucoconjugados", se refiere a compuestos que incluyen un amino azúcar o hidrato de carbono unido de manera covalente con otra molécula. Los subgrupos de aminoglucoconjugados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aminoglucoproteínas, aminoglucósidos, glucosaminoglucanos y aminoglucopeptidos. Los "aminoglucopeptidos" son compuestos que incluyen un azúcar amino o hidrato de carbono unido de manera covalente a uno o más péptidos, incluyendo derivados sintéticos o químicamente modificados. Los aminoglucopeptidos incluyen, pero no se limitan a vancomicina, teicoplanina, bleomicina, peptidoglucano, ristocetina, sialoglucoproteínas, orienticina, avaporcina, helevecardina, galacardina y actinoidina. Los derivados de estos compuestos también se incluyen, por ejemplo, los proporcionados mediante alquilación reductora de aminas reactivas. Véase, Sundram *et al.*, J. Org. Chem. 60:1102-03 (1995). Las patentes estadounidenses n.^{os} 4.639.433, 4.643.987 y 4.698.327 enseñan derivados de N-alquilo y N-acilo de vancomicina. Las patentes europeas n.^{os} 435 503A1 y 667 353 A1, describieron alquilaciones reductoras de una variedad de aminoglucopeptidos incluyendo vancomicina y orienticina A. De manera similar, "aminoglucósidos" son compuestos que incluyen al menos dos azúcares amino unidos mediante enlaces glucosídicos a una estreptidina o una 2-desoxiestreptamina o sus análogos. Los análogos pretenden incluir aminoglucósidos modificados, por ejemplo, para aumentar la resistencia a escisión enzimática. Tales derivados (por ejemplo, amikacina, un derivado semisintético de kanamicina), son necesarios para el tratamiento de individuos o poblaciones que han desarrollado resistencia a otros aminoglucósidos, y todos de tales derivados desarrollados en el presente o en el futuro son aminoglucósidos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los análogos también pretenden incluir los aminociclitolos estructuralmente relacionados (por ejemplo, espectinomicina). Los aminoglucósidos incluyen, pero no se limitan a, gentamicina, netilmicina, tobramicina, amikacina, kanamicina A, kanamicina B, neomicina, paromomicina, neamina, estreptomomicina, dihidroestreptomomicina, apramicina, ribostamicina y espectinomicina. Los aminoglucósidos pueden agruparse opcionalmente como estreptomocinas (por ejemplo, estreptomomicina y dihidroestreptomomicina), kanamicinas (por ejemplo, kanamicina, amikacina, tobramicina), gentamicinas (por ejemplo, gentamicina y netilmicina), y

neomicinas. La apramicina y especinomicina son aminoglucósidos usados normalmente por veterinarios para tratar animales no humanos.

En otra realización de la divulgación, la molécula biológicamente relevante es una equinocandina. En una realización particularmente preferida, la equinocandina es una o más de lo siguiente: caspofungina, equinocandina B, aculeacina A, micafungina, anidulafungina, cilofungina y pneumocandina.

En algunas realizaciones de la divulgación, la molécula biológicamente relevante es un ácido nucleico, polipéptido, y/o un anticuerpo.

Por ejemplo, la encocleación de moléculas de ácido nucleico antisentido, es decir, moléculas que son complementarias a una diana de ácido nucleico sentido, por ejemplo, complementarias a la hebra codificante de una molécula de ADNc o ARNm bicatenario puede ser útil. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico antisentido puede unirse por hidrógeno a (es decir, hibridarse con) una diana de ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a toda una hebra codificante, o sólo a una porción de la misma, por ejemplo, toda o parte de la región codificante de proteínas (o marco de lectura abierto). Una molécula de ácido nucleico antisentido también puede ser antisentido para toda o parte de una región no codificante de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la divulgación. Las regiones no codificantes ("regiones no traducidas 5' y 3'") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más nucleótidos de longitud. Puede construirse un ácido nucleico antisentido de la divulgación usando reacciones de ligación enzimática y síntesis química usando procedimientos conocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico antisentido de la divulgación se administran normalmente a un sujeto o se generan *in situ* de modo que se hibridan con o se unen a ARNm celular y/o ADN genómico que codifica para un polipéptido correspondiente a un marcador seleccionado de la divulgación para inhibir de ese modo la expresión del marcador, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser mediante complementariedad de nucleótido convencional para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en la ranura principal de la doble hélice. Los ejemplos de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la divulgación incluyen inyección directa en un sitio tisular o infusión del ácido nucleico antisentido en un líquido corporal asociado a la sangre o la médula ósea. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a células seleccionadas y luego administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de modo que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados sobre una superficie celular seleccionada, por ejemplo, uniendo las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a antígenos o receptores de la superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden suministrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento. Para lograr concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren constructos de vector en los que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

Una molécula de ácido nucleico antisentido de la divulgación puede ser una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, al contrario que las α -unidades habituales, las hebras son paralelas entre sí (Gaultier *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.*, 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Un "agente de interferencia de ARN" tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier agente que interfiere con o inhibe la expresión de un gen diana, por ejemplo, un marcador de la divulgación, mediante interferencia de ARN (iARN). Tales agentes de interferencia de ARN incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ácido nucleico que incluyen moléculas de ARN que son homólogas al gen diana, por ejemplo, un marcador de la divulgación, o un fragmento del mismo, ARN pequeño de interferencia (ARNip), y moléculas pequeñas que interfieren con o inhiben la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN (iARN).

"Interferencia de ARN (iARN)" es un proceso evolutivamente conservado mediante el cual la expresión o introducción de ARN de una secuencia que es idéntica o muy similar a un gen diana da como resultado la degradación específica de secuencia o silenciamiento génico postranscripcional específico (SGPT) de ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir de ese gen seleccionado como diana (véase Coburn, G. y Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225), inhibiendo de ese modo la expresión del gen diana (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente estadounidense n.ºs: 20030153519A1; 20030167490A1; y las patentes estadounidenses n.ºs: 6.506.559; 6.573.099. En una realización, el ARN es ARN bicatenario (ARNbc). Este proceso se ha descrito en células de plantas, invertebrados y mamíferos. En la naturaleza, la iARN se inicia mediante la endonucleasa específica de ARNbc Dicer, que promueve la escisión procesiva de ARNbc largo en fragmentos bicatenarios denominados ARNip. Los ARNip se incorporan en un complejo de proteína que reconoce y escinde ARNm dianas. La iARN también puede iniciarse introduciendo moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, agentes de interferencia de ARN o ARNip sintéticos, para inhibir o silenciar la expresión de genes diana. Tal como se usa en el presente documento,

“inhibición de la expresión de genes diana” o “inhibición de la expresión de genes marcadores” incluye cualquier disminución en la expresión o actividad de proteína o nivel del gen diana (por ejemplo, un gen marcador de la divulgación) o proteína codificada por el gen diana, por ejemplo, una proteína marcadora de la divulgación. La disminución puede ser de al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% o más en comparación con la expresión de un gen diana o la actividad o nivel de la proteína codificada por un gen diana que no se ha seleccionado como diana un agente de interferencia de ARN.

La presente divulgación también contempla “ARN corto de interferencia” (ARNip), también se denomina en el presente documento “ARN pequeño de interferencia.” Una molécula de este tipo se define como un agente que actúa para inhibir la expresión de un gen diana, por ejemplo, mediante iARN. Tal como se usa en el presente documento, el término ARNip se pretende que sea equivalente a cualquier término en la técnica definido como una molécula capaz de mediar iARN específica de secuencia. Tales equivalentes incluyen, por ejemplo, ARN bicatenario (ARNbc), microARN (mARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido corto de interferencia y ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt). Un ARNip puede sintetizarse químicamente, puede producirse mediante transcripción *in vitro* o puede producirse dentro de una célula huésped. En una realización, ARNip es una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 28 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, y más preferiblemente de aproximadamente 19, 20, 21 ó 22 nucleótidos de longitud, y puede contener una proyección 3' y/o 5' en cada hebra que tiene una longitud de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos. La longitud de la proyección es independiente entre las dos hebras, es decir, la longitud de la proyección en una hebra no depende de la longitud de la proyección en la segunda hebra. Preferiblemente, el ARNip es capaz de promover la interferencia de ARN a través de la degradación o silenciamiento génico postranscripcional específico (SGPT) del ARN mensajero (ARNm) diana.

En otra realización, un ARNip es un ARN de horquilla corta (también denominada tallo-bucle) (ARNhc). En una realización, estos ARNhc se componen de una hebra antisentido corta (por ejemplo, 19-25 nucleótidos), seguida por un bucle de 5-9 nucleótidos, y la hebra sentido análoga. Alternativamente, la hebra sentido puede preceder la estructura en bucle de nucleótido y puede seguir la hebra antisentido. Estos ARNhc pueden estar contenidos en plásmidos, retrovirus y lentivirus y expresarse a partir de, por ejemplo, el promotor pol III U6, u otro promotor (véase por ejemplo, Stewart, *et al.* (2003) RNA Apr; 9(4):493-501. Pueden administrarse agentes de interferencia de ARN, por ejemplo, moléculas de ARNip, a un sujeto que tiene o en riesgo de tener cáncer, para inhibir la expresión de un gen marcador de la divulgación, por ejemplo, un gen marcador que se sobreexpresa en cáncer (tal como los marcadores enumerados en la tabla 3) y de ese modo tratar, prevenir o inhibir el cáncer en el sujeto.

La presente divulgación también abarca ribozimas. Las ribozimas son moléculas catalíticas de ARN con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, para el que tienen una región complementaria. Por tanto, pueden usarse ribozimas (por ejemplo, ribozimas en cabeza de martillo tal como se describe en Haselhoff y Gerlach, 1988, Nature 334:585-591) para escindir catalíticamente transcritos de ARNm para inhibir de ese modo la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Puede diseñarse una ribozima que tiene especificidad por una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido diana basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc correspondiente al marcador. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos que va a escindirse (véase Cech *et al.* patente estadounidense n.º 4.987.071; y Cech *et al.* patente estadounidense n.º 5.116.742). Alternativamente, puede usarse un ARNm que codifica para un polipéptido de la divulgación para seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad ribonucleasa específica de una agrupación de moléculas de ARN (véase, por ejemplo, Bartel y Szostak, 1993, Science 261:1411-1418).

La presente divulgación también abarca moléculas de ácido nucleico que forman estructuras de triple hélice. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de la divulgación puede iniciarse seleccionando como diana secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen que codifica para el polipéptido (por ejemplo, el promotor y/o potenciador) para formar estructuras de triple hélice que evitan la transcripción del gen en células diana. Véase generalmente Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher (1992) Bioassays 14(12):807-15.

En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico pueden modificarse en la molécula base, molécula de azúcar o estructura principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura principal de desoxirribosa fosfato de las moléculas de ácido nucleico puede modificarse para generar moléculas de ácido nucleico peptídico (véase Hyrup *et al.*, 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23). Tal como se usa en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos peptídicos” o “PNA” se refieren a miméticos de ácido nucleico, por ejemplo, miméticos de ADN, en los que la estructura principal de desoxirribosa fosfato se sustituye por una estructura principal de pseudopéptido y sólo se conservan las cuatro nucleobases naturales. La estructura principal neutra de PNA ha mostrado permitir una hibridación específica con ADN y ARN en condiciones de baja fuerza iónica. La síntesis de oligómeros de PNA puede realizarse usando protocolos de síntesis de péptidos en fase sólida convencionales tal como se describe en Hyrup *et al.* (1996), anteriormente; Perry-O’Keefe *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675.

Los PNA pueden usarse en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, los PNA pueden usarse como agentes antisentido o antigénicos para modulación específica de secuencia de la expresión génica, por ejemplo, induciendo detención de la transcripción o traducción o inhibiendo la replicación. Los PNA también pueden usarse, por ejemplo, en el análisis de mutaciones de un solo par de bases en un gen mediante, por ejemplo, pinzamiento de PCR dirigido a PNA; como enzimas de restricción artificiales cuando se usa en combinación con otras enzimas, por ejemplo, nucleasas S1 (Hyrup (1996), anteriormente; o como sondas o cebadores para hibridación y secuencia de ADN (Hyrup, 1996, anteriormente; Perry-O'Keefe et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675).

En otra realización, los PNA pueden modificarse, por ejemplo, para potenciar su estabilidad o captación celular, uniendo grupos lipófilos u otros auxiliares a PNA, mediante la formación de quimeras de PNA-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de suministro de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras de PNA-ADN que pueden combinar las propiedades ventajosas de PNA y ADN. Tales quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento de ADN, por ejemplo, ARNasa H y ADN polimerasas, interactuar con la porción de ADN mientras que la porción de PNA proporcionaría alta afinidad de unión y especificidad. Las quimeras de PNA-ADN pueden unirse usando ligadores de longitudes apropiadas en cuanto a apilamiento de base, número de enlaces entre las nucleobases y orientación (Hyrup, 1996, anteriormente). La síntesis de quimeras de PNA-ADN puede realizarse tal como se describe en Hyrup (1996), anteriormente, y Finn *et al.* (1996) Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63. Por ejemplo, puede sintetizarse una cadena de ADN sobre un soporte sólido usando química de acoplamiento de fosforamidita convencional y análogos de nucleósidos modificados. Pueden usarse compuestos tales como 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita como enlace entre el PNA y el extremo 5' de ADN (Mag *et al.*, 1989, Nucleic Acids Res. 17:5973-88). Los monómeros de PNA se acoplan entonces por etapas para producir una molécula quimérica con un segmento de PNA 5' y un segmento de ADN 3' (Finn *et al.*, 1996, Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63). Alternativamente, pueden sintetizarse moléculas quiméricas con un segmento de ADN 5' y un segmento de PNA 3' (Peterser *et al.*, 1975, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-11124).

En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para seleccionar como diana receptores de célula huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a lo largo de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; publicación PCT n.º WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes de escisión desencadenados por hibridación (véase, por ejemplo, Krol *et al.*, 1988, Bio/Techniques 6:958-976) o agentes de intercalamiento (véase, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación desencadenado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenado por hibridación, etc.

La presente divulgación también incluye moléculas de ácido nucleico de baliza molecular que tienen al menos una región que es complementaria a una molécula de ácido nucleico de la divulgación, de modo que la baliza molecular es útil para cuantificar la presencia de la molécula de ácido nucleico de la divulgación en una muestra. Un ácido nucleico de "baliza molecular" es una molécula de ácido nucleico que comprende un par de regiones complementarias y que tienen un extintor fluorescente y un fluoróforo asociado con las mismas. El fluoróforo y el extintor se asocian con diferentes porciones del ácido nucleico en una orientación tal que cuando las regiones complementarias se hibridan entre sí, la fluorescencia del fluoróforo se extingue mediante el extintor. Cuando las regiones complementarias de las moléculas de ácido nucleico no se hibridan entre sí, la fluorescencia del fluoróforo se extingue hasta un menor grado. Se describen moléculas de ácido nucleico de baliza molecular, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.876.930.

Además, se contemplan aptámeros y pueden producirse usando la metodología divulgada en la patente estadounidense n.º 5.270.163 y el documento WO 91/19813.

La presente divulgación también se refiere a proteínas aisladas que tienen una actividad biológica deseada. Pueden aislarse polipéptidos nativos de interés de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas convencionales, producidas mediante técnicas de ADN recombinante, o sintetizarse químicamente usando métodos de síntesis de péptidos convencionales. Normalmente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, pueden prepararse otras porciones biológicamente activas, en las que se delecionan otras regiones de la proteína, mediante técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de la divulgación.

La divulgación también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende todo o parte (preferiblemente una parte biológicamente activa) de un polipéptido correspondiente a un biomarcador de la divulgación unido operativamente a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido distinto del polipéptido correspondiente al biomarcador). Dentro de la proteína de fusión, el término "unido operativamente" se pretende que indique que el polipéptido de la divulgación y el polipéptido heterólogo se fusionan en marco entre sí. El polipéptido heterólogo puede fusionarse con el extremo amino terminal o el extremo carboxilo terminal del polipéptido de la divulgación. Tales proteínas de fusión se

conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, proteínas o polipéptidos diana que potencian o inhiben la actividad de tales proteínas diana fusionadas a secuencias de señal heterólogas, etiquetas de péptidos, proteínas de fusión de inmunoglobulina, y similares. Pueden producirse proteínas quiméricas y de fusión de la divulgación mediante técnicas convencionales de ADN recombinante. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automáticos. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden posteriormente hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, anteriormente). Además, muchos vectores de expresión están disponibles comercialmente que ya codifican para una molécula de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la divulgación puede clonarse en un vector de expresión de este tipo de modo que la molécula de fusión se une en marco al polipéptido de la invención.

También se contemplan anticuerpos que se unen a molécula diana de interés o tienen una actividad biológica de interés (por ejemplo, para potenciar o inhibir apropiadamente la actividad de un proceso biológico). Un polipéptido diana aislado o un fragmento del mismo (o un ácido nucleico que codifica para tal polipéptido) puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a dicho inmunógeno, usando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales.

A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” abarcan ampliamente formas de anticuerpos que se producen de manera natural (por ejemplo IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos de cadenas sencillas, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todo lo anterior, fragmentos y derivados que tienen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpo pueden comprender una proteína o molécula química conjugada con un anticuerpo.

El término “anticuerpo” tal como se usa en el presente documento también incluye una “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo”). El término “porción de unión a antígeno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno diana. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite que estén elaborados como una cadena de proteína sencilla en la que las regiones VL y VH se emparejan formando polipéptidos monovalentes (conocidos como Fv de cadenas sencillas (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:5879-5883; y Osbourn *et al.* 1998, Nature Biotechnology 16: 778). Tales anticuerpos de cadenas sencillas también se prevé que estén abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo. Cualquier secuencia de VH y VL de scFv específico puede unirse a secuencias genómicas o ADNc de región constante de inmunoglobulina humana, con el fin de generar vectores de expresión que codifican para polipéptidos de IgG completos u otros isotipos. También pueden usarse VH y VL en la generación de Fab, Fv u otros fragmentos de inmunoglobulinas usando o bien química de proteínas o bien tecnología de ADN recombinante. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadenas sencillas, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, específicos en los que se expresan dominios VH y VL en una cadena de polipéptido sencilla, pero usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de ese modo que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

Todavía adicionalmente, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de polipéptidos de inmunoadhesión mayores, formados por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales polipéptidos de inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo de estreptavidina para la elaboración de un polipéptido scFv tetramérico (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) y uso de un residuo de cisteína, un marcador péptido y una etiqueta de polihistidina C-terminal para elaborar polipéptidos scFv bivalentes y biotinilados (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Pueden prepararse porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, pueden obtenerse anticuerpos, porciones de anticuerpo y polipéptidos de inmunoadhesión usando técnicas convencionales de ADN recombinante, tal como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos y singénicos; o formas

modificadas de los mismos (por ejemplo, humanizados, quiméricos, etc.). Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Preferiblemente, los anticuerpos de la divulgación se unen específicamente o sustancialmente de manera específica a polipéptidos de la ruta de señalización prosupervivencia o fragmentos de los mismos. Los términos “anticuerpos monoclonales” y “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usa en el presente documento, se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen sólo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular de un antígeno, mientras que los términos “anticuerpos policlonales” y “composición de anticuerpo policlonal” se refieren a una población de polipéptidos de anticuerpo que contienen múltiples especies de sitios de unión a antígeno capaces de interactuar con un antígeno particular. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta normalmente una afinidad de unión individual para un antígeno particular con el que inmunorreacciona.

Los cocleatos de la presente invención pueden prepararse con un amplio intervalo de razones de molécula biológicamente relevante con respecto a lípido. A modo de ejemplo, la razón de molécula biológicamente relevante con respecto a lípido puede estar entre aproximadamente 20.000:1 y aproximadamente 0,5:1 en peso o cualquier intervalo entre medias. En una realización, la razón es de aproximadamente 1:1 en peso. En otras, la razón es de aproximadamente 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1, 200:1 o 400:1 en peso o cualquier intervalo entre medias. Todos los intervalos y valores individuales entre 20.000:1 y 0,5:1 están abarcados por la invención.

Los cocleatos de la presente invención pueden incluir opcionalmente una o más moléculas biológicamente relevantes adicionales, tal como en terapias de combinación.

En una realización, la molécula biológicamente relevante se une mediante una interacción electrostática, hidrófoba, covalente o iónica con un componente lipídico del cocleato, tal como una cola hidrófoba o se une a un componente de la bicapa del cocleato, por ejemplo, un fosfolípido u otro lípido. Puede lograrse la unión de manera covalente de la molécula biológicamente relevante al lípido mediante reticulación por métodos conocidos. Alternativamente, el enlace covalente es reversible de modo que la molécula biológicamente relevante puede separarse del componente lipídico o cola hidrófoba en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una molécula biológicamente relevante puede unirse a un fosfolípido por medio de un ligador que puede escindirse mediante una enzima endógena a un tejido, órgano o estructura diana (por ejemplo, una proteína plasmática, proteína intersticial, un endosoma o el medio intracelular), de modo que la molécula biológicamente relevante se suministra al tejido, órgano u otra estructura diana. En realizaciones alternativas, la molécula biológicamente relevante puede unirse mediante cualquier otro medio, por ejemplo, mediante interacciones electrostáticas y/o interacciones hidrófobas.

En otra realización, la molécula biológicamente relevante se une mediante una interacción electrostática, hidrófoba, covalente o iónica con un grupo de cabeza del componente lipídico del cocleato.

La molécula biológicamente relevante puede asociarse con el componente lipídico o cola hidrófoba o grupo de cabeza del componente lipídico en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, la molécula biológicamente relevante se asocia con el componente lipídico, de modo que la molécula biológicamente relevante se disocia con el componente lipídico tras contacto con un entorno diana. La molécula biológicamente relevante puede unirse a un componente del cocleato con cualquiera de los ligadores descritos en el presente documento, por ejemplo, un ligador que es reducible, o de otro modo reversible o digerible mediante una enzima, proteína, o molécula endógena al entorno diana. La enzima puede ser una enzima extracelular, intracelular o endosomal endógena al sujeto. En otra realización, el componente de molécula biológicamente relevante se asocia electrostáticamente con el componente lipídico y se disocia con el cocleato tras contacto con un gradiente de pH en una célula u órgano del sujeto.

C. Inhibidores de la agregación

En algunas realizaciones, los cocleatos de la presente invención pueden incluir opcionalmente uno o más inhibidores de la agregación. El término “inhibidor de la agregación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que inhibe la agregación de cocleatos. El inhibidor de la agregación normalmente está presente al menos sobre la superficie del cocleato, y puede estar sólo presente sobre la superficie del cocleato (por ejemplo, cuando se introduce el inhibidor de la agregación después de la formación de cocleato). Los inhibidores de la agregación pueden añadirse antes, después o durante la formación de cocleatos. El tipo y/o cantidad de inhibidor de la agregación puede ajustarse para obtener un tamaño y/o distribución de cocleato deseado. Además o alternativamente, puede(n) usarse inhibidor(es) de la agregación para estabilizar el tamaño y/o distribución de tamaño de cocleato de modo que la agregación de cocleatos se minimiza o elimina.

La formación de cocleatos puede preverse como un acontecimiento de cristalización que se produce de manera espontánea tras la interacción de lípidos cargados y cationes multivalentes cargados de manera opuesta. Sin embargo, la modulación del tamaño de cristales de cocleato formados ha demostrado ser difícil antes de la presente invención.

En suspensión acuosa, los cocleatos simples se agregan generalmente y tras almacenamiento a largo plazo forman masas mayores que pueden ser de varios micrómetros de tamaño. Debido a la asociación del calcio con el grupo de

cabeza lipídico, las superficies de los cocleatos tienen un carácter hidrófobo. Cuando se suspende en tampón acuoso, la agregación de cocleatos es una consecuencia de interacciones hidrófobas, lo que minimiza la cantidad de área superficial expuesta a agua.

- 5 Tal agregación puede inhibirse e incluso revertirse, y pueden estabilizarse partículas de cocleato individuales cambiando las propiedades superficiales de los cocleatos e inhibiendo de ese modo la interacción cocleato-cocleato.

10 La agregación puede inhibirse incluyendo en la suspensión de liposomas un material que evita la interacción liposoma-liposoma en el momento de adición de calcio y después de la misma. Alternativamente, el inhibidor de la agregación puede añadirse después de la formación de cocleatos. Además, la cantidad de inhibidor de la agregación puede variarse, permitiendo por tanto la modulación del tamaño de partícula de los cocleatos.

15 Tales composiciones son ventajosas por varios motivos incluyendo que cocleatos más pequeños pueden permitir una captación mayor por las células y rápida eficacia. Una composición de este tipo es adecuada, por ejemplo, cuando se desea suministrar rápida y eficazmente una molécula biológicamente relevante (por ejemplo, un agente antifúngico o antibacteriano contra una infección fúngica o bacteriana). Además, el tamaño de partícula puede tener un efecto de direccionamiento en que algunas células pueden absorber partículas de un tamaño determinado de manera más o menos eficaz. El tamaño también puede afectar a la manera en la que los cocleatos interactúan con una célula (por ejemplo, captación o acontecimientos de fusión).

20 Los inhibidores de la agregación trabajan en parte modificando las características superficiales de los cocleatos de modo que se inhibe la agregación. La agregación puede inhibirse, por ejemplo, mediante volumen estérico alrededor del cocleato, que inhibe la agregación y/o cambia la naturaleza de la estructura de cocleato, por ejemplo, un cambio en la hidrofobicidad superficial y/o carga superficial.

25 Los términos “recubrir”, “recubierto”, “recubrimiento”, y similares, a menos que se indique lo contrario, se refieren a un agente (por ejemplo un inhibidor de la agregación) presente al menos sobre las superficies exteriores de un cocleato. Tales agentes pueden asociarse con la bicapa mediante incorporación de al menos parte del agente en la bicapa, y/o pueden de otro modo asociarse, por ejemplo, mediante atracción iónica al catión o atracción hidrófoba o iónica al lípido.

35 Tal como se comenta en el presente documento, los cocleatos pueden formarse mediante la reestructuración inducida por calcio y fusión del lípido, por ejemplo, fosfolípido tal como fosfatidilserina (PS). Debido a la naturaleza hidrófoba de las superficies de cocleatos en disoluciones acuosas, que contienen calcio, los cocleatos formados sin los inhibidores de la agregación de la invención pueden agregarse y formar masas mayores, por ejemplo, estructuras de tipo aguja en cocleatos de aspirina. Limitar y/o inhibir la interacción de liposomas que pueden coalescer en cocleatos en el momento de la adición de cationes limita el tamaño del cristal de cocleato resultante, y evita la agregación en partículas mayores. La adición de un inhibidor de la agregación (por ejemplo, caseína) a liposomas antes de la adición de calcio da como resultado estructuras de nanococleato no agregadas estables.

40 El tipo y/o la cantidad de inhibidor de la agregación usado también pueden determinar el tamaño del cocleato resultante. La presencia de un inhibidor de la agregación en concentraciones que difieren también permite la regulación de la distribución del tamaño de cocleato.

45 La adición de uno o más inhibidores de la agregación después de la formación de cocleatos también inhibe e incluso revierte la agregación.

50 Los inhibidores de la agregación adecuados que pueden usarse según la presente invención, incluyen pero no se limitan a al menos uno de los siguientes: caseína, kappa-caseína, leche, albúmina, albúmina sérica, albúmina sérica bovina, albúmina sérica de conejo, metilcelulosa, etilcelulosa, propilcelulosa, hidroxilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, pululano, poli(alcohol vinílico), alginato de sodio, polietilenglicol, óxido de polietileno, goma xantana, goma tragacanto, goma guar, goma acacia, goma arábica, poli(ácido acrílico), copolímero de metilmetacrilato, polímero de carboxivinilo, amilosa, almidón de alto contenido en amilosa, almidón de alto contenido en amilosa hidroxipropilado, dextrina, pectina, quitina, quitosano, levano, elsinano, colágeno, gelatina, zeína, gluten, carragenano, cera carnaúba, goma laca, polímeros de látex, aislado de proteína de leche, aislado de proteína de soja, aislado de proteína de lactosuero y mezclas de los mismos.

60 Un inhibidor de la agregación preferido es la caseína. La caseína es una proteína muy fosforilada de unión a calcio. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, se cree que el calcio media una interacción entre lípido cargado negativamente (por ejemplo, PS) y caseína, cambiando de ese modo las propiedades superficiales de los cocleatos de modo que se inhibe la agregación. Otro inhibidor de la agregación preferido es leche y otros productos lácteos tales como crema semidesnatada, etc. Los productos lácteos preferidos también contienen caseína. Otro inhibidor de la agregación preferido es un excipiente, por ejemplo, metilcelulosa. Otros inhibidores de la agregación preferidos incluyen albúmina, albúmina sérica, albúmina sérica bovina y albúmina sérica de conejo.

65

Puede usarse más de un inhibidor de la agregación en las composiciones de la invención. Por ejemplo, pueden usarse tanto leche como metilcelulosa como inhibidor de la agregación.

5 En una realización, las composiciones de cocleato de la invención incluyen entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 0,1% de inhibidor de la agregación. Preferiblemente, el inhibidor de la agregación comprende aproximadamente el 1% de la composición de cocleato. En otra realización, las composiciones de cocleato de la invención incluyen una razón de inhibidor de la agregación con respecto a lípido de entre aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 4:1 en peso. La razón de inhibidor de la agregación con respecto a lípido puede ser de aproximadamente 1:1. Un experto habitual en la técnica será capaz de determinar fácilmente la cantidad de inhibidor de la agregación necesaria para formar cocleatos del tamaño deseado con solamente experimentación de rutina.

10 En otra realización, el inhibidor de la agregación puede usarse en una cantidad para lograr las composiciones de cocleato que tienen un tamaño de partícula relativamente mayor que el que puede lograrse sin o con otros inhibidores de la agregación (por ejemplo, si se usa más y/o un inhibidor de la agregación diferente). Una composición de este tipo puede ser útil, por ejemplo, cuando se desea captación y/o liberación retardada de la molécula biológicamente relevante, o cuando células u órganos seleccionados como diana absorben más eficazmente cocleatos en el intervalo de tamaño relativamente mayores. Tales composiciones también pueden tener actividad sostenida (en relación con composiciones de cocleato más pequeñas) porque la molécula biológicamente relevante puede tardar más en liberarse de un cocleato mayor, por ejemplo, si se requieren múltiples acontecimientos de fusión.

15 En aún otra realización, la cantidad y/o tipos de inhibidor de la agregación pueden escogerse para fabricar una composición de cocleato que tiene una distribución de tamaño de partícula amplia de modo que la molécula biológicamente relevante se libera a lo largo de un periodo de tiempo porque los cocleatos más pequeños se absorben inicialmente seguido por acontecimientos de fusión o absorción con cocleatos cada vez mayores. Además, el tamaño puede no sólo afectar al tipo de células que absorben el cocleato, sino también cómo los cocleatos interactúan con determinadas células, por ejemplo, el tamaño puede afectar si un cocleato se absorbe por una célula o experimenta uno o más acontecimientos de fusión con una célula.

20 Además, en todavía otra realización, pueden combinarse varias composiciones para perfiles de liberación deseados, por ejemplo, una liberación por pulsos o liberación combinada. Por ejemplo, una composición de nanococleato de liberación rápida puede mezclarse con una composición de cocleato de mayor tamaño de liberación retardada o incluso convencional, de modo que se realizan una liberación tanto inmediata como retardada. En un caso a modo de ejemplo, se administran tanto cocleatos de antibióticos pequeños y grandes con el fin de tratar un sujeto con una alta dosis inicial (cocleatos pequeños) y para mantener suficiente antibiótico en el suero para ser eficaz contra las bacterias restantes (cocleatos grandes). Además, las composiciones de cocleato pueden tener diferentes moléculas biológicamente relevantes, por ejemplo, puede formularse un medicamento protector del estómago con nanococleatos para liberación inicial (o una gran distribución para liberación a largo plazo), y pueden formularse uno o más fármacos antiinflamatorios no esteroideos con cocleatos mayores (AINE) para liberación después de que se libere el medicamento protector del estómago.

25 También puede usarse un inhibidor de la agregación para estabilizar el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula. Por ejemplo, puede usarse para "bloquear" el tamaño y la distribución de cocleato de cocleatos convencionales y/o cocleatos que tienen un inhibidor de la agregación. Aunque las composiciones de cocleato de la presente invención son estables normalmente durante largos periodos de tiempo, los cocleatos convencionales (cocleatos formados sin inhibidores de la agregación) pueden tender a agregarse a lo largo del tiempo. Por tanto, los cocleatos convencionales pueden reducirse en tamaño y/o estabilizarse mediante adición a tales inhibidores de la agregación, por ejemplo, adición de metilcelulosa después de la formación de cocleatos.

30 Los cocleatos formados en presencia de inhibidores de la agregación no tienen o tienen agregación reducida en relación con la ausencia del inhibidor de la agregación. Por consiguiente, tales composiciones son ventajosas por varios motivos incluyendo, por ejemplo, mayor captación por las células, y eficacia aumentada. Las composiciones de cocleato de la invención tienen preferiblemente un diámetro medio menor de aproximadamente 5, 4, 3, 2 ó 1 micrómetros. Las composiciones de cocleato pueden tener un diámetro medio de menos de aproximadamente 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm o 100 nm. Todos los valores individuales entre estos valores (880, 435, 350), pretenden incluirse y están dentro del alcance de la presente invención. En otra realización, las composiciones de cocleato de la invención incluyen poblaciones de cocleato que tienen un diámetro medio aproximadamente igual a o mayor de aproximadamente 1 micrómetro, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 50 ó 100 micrómetros. Todos los intervalos y valores individuales dentro de estos intervalos pretenden incluirse y están dentro del alcance de la presente invención.

35 La distribución de tamaño puede ser estrecha en relación con la observada en cocleatos convencionales (cocleatos formados sin inhibidores de la agregación). La distribución de tamaño de composiciones de cocleato con inhibidores de la agregación puede mejorarse significativamente en relación con la observada en composiciones de cocleato convencionales. Preferiblemente, los cocleatos tienen una distribución de tamaño de menos de aproximadamente 30, 20, 10, 5, 3 ó 1 mm, 900 nm, 800 nm, 700 nm, 600 nm, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm o 100 nm. Todos los

valores individuales entre estos valores (550 nm, 420 nm, 475 nm, etc.) pretenden incluirse y están dentro del alcance de la presente invención. Tales composiciones son particularmente deseables cuando se desea captación por macrófagos. Puede apreciarse fácilmente que el tamaño de partícula puede ajustarse a un tamaño adecuado para captación por células u órganos deseados y/o inadecuado para captación por órganos o células. En otra realización, se usa una distribución de tamaño de cocleatos más amplia, por ejemplo, de aproximadamente 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y más micrómetros. Todos los valores individuales dentro de estos intervalos pretenden incluirse y están dentro del alcance de la presente invención. Tales composiciones pueden ser útiles para liberación a largo plazo de moléculas biológicamente relevantes.

Además, tal como se comentó anteriormente, se contemplan combinaciones de poblaciones de cocleato con una o más moléculas biológicamente relevantes, una o más distribuciones de tamaño, y uno o más diámetros medios, para lograr un patrón de liberación deseado, por ejemplo, liberación por pulsos, liberación retardada y/o liberación sostenida de diferentes moléculas biológicamente relevantes.

15 II. Métodos de elaboración de cocleatos

La invención proporciona métodos para formar cocleatos según la reivindicación 11. Puede usarse cualquier método conocido para formar cocleatos, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.078.052; 5.643.574; 5.840.707; 5.994.318; 6.153.217; 6.592.894, así como las publicaciones PCT n.^{os} WO 2004/091572; WO 2004/091578; WO 2005/110361 y publicación de patente estadounidense 2010/0178325.

En una realización, el método incluye generalmente introducir una molécula biológicamente relevante a un lípido en presencia de un disolvente, añadir una disolución acuosa para formar liposomas, y precipitar los liposomas para formar un cocleato. Por ejemplo, el método incluye generalmente introducir una molécula biológicamente relevante a un liposoma en presencia de un disolvente de modo que la molécula biológicamente relevante se asocia con el liposoma, y precipitar el liposoma para formar un cocleato de molécula biológicamente relevante.

La etapa de introducir una molécula biológicamente relevante a un liposoma en presencia de un disolvente puede lograrse en una variedad de formas, todas las cuales están abarcadas dentro del alcance de la presente invención. En una realización, la molécula biológicamente relevante se introduce introduciendo una disolución del disolvente y la molécula biológicamente relevante en el liposoma. Preferiblemente, el liposoma está en una suspensión liposomal, preferiblemente, una suspensión liposomal acuosa. En una realización preferida, la disolución se introduce en el liposoma mediante adición gota a gota de la disolución. En otras realizaciones, la disolución puede añadirse mediante flujo continuo o como bolo. Además, la disolución puede introducirse en lípidos secos, con agua añadida antes, después o con la disolución.

En otra realización, la molécula biológicamente relevante se introduce en el liposoma antes o después del disolvente. Por ejemplo, la molécula biológicamente relevante puede introducirse en una suspensión liposomal que incluye el disolvente. Entonces la mezcla puede agitarse, mezclarse, agitarse con vórtex, etc. Para facilitar la asociación de la molécula biológicamente relevante con el liposoma. La molécula biológicamente relevante introducida puede estar en forma de un líquido o un polvo.

El liposoma puede prepararse mediante cualquier método conocido de preparar liposomas. Por tanto, los liposomas pueden prepararse, por ejemplo, mediante inyección de disolvente, hidratación de lípidos, evaporación inversa, secado por congelación mediante congelación repetida y descongelamiento. Los liposomas pueden ser multilaminares (MLV) o unilaminares (ULV), incluyendo vesículas unilaminares pequeñas (SUV). La concentración de lípido en estas disoluciones liposomales puede ser desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta 500 mg/ml. Preferiblemente, la concentración de lípido es desde aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, más preferiblemente desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml.

Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares grandes (LUV), vesículas plurilaminares estables (SPLV) o vesículas oligolaminares (OLV) preparadas, por ejemplo, mediante eliminación de detergente usando diálisis, cromatografía en columna, bioperlas SM-2, mediante evaporación de fase inversa (REV), o mediante formación de vesículas unilaminares de tamaño intermedio mediante extrusión a alta presión. Methods in Biochemical Analysis, 33:337 (1988). Los liposomas elaborados mediante estos y otros métodos conocidos en la técnica pueden usarse en la práctica de la presente invención.

En una realización al menos la mayoría de los liposomas son unilaminares. El método puede incluir además la etapa de filtrar una suspensión liposomal y/o extruir de manera mecánica la suspensión a través de una pequeña apertura que incluye tanto liposomas MLV como ULV, de modo que la mayoría de los liposomas son ULV. En realizaciones preferidas, al menos el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de los liposomas son ULV.

En otra realización, el cocleato se forma por precipitación. El liposoma puede precipitarse con un catión multivalente para formar una molécula-cocleato biológicamente relevante. El catión multivalente puede consistir totalmente o consistir esencialmente en un metal catiónico, incluyendo, pero sin limitarse a calcio, magnesio, bario, zinc y/o

hierro. Además o alternativamente, el catión multivalente puede incluir otros compuestos de catión multivalente. Tal como se usa en el presente documento, el término "multivalente" se refiere a iones que tienen una valencia de al menos 2, por ejemplo, divalente, trivalente, etc.

5 Puede usarse cualquier disolvente adecuado en relación con la presente invención. Los disolventes adecuados para una aplicación dada puede identificarlos fácilmente un experto en la técnica. Preferiblemente, el disolvente es un disolvente aceptable por la FDA.

10 El disolvente puede ser un disolvente orgánico o un disolvente inorgánico. En una realización, el disolvente es un disolvente miscible en agua. Los disolventes adecuados incluyen pero no se limitan a dimetilsulfóxido (DMSO), una metilpirrolidona, N-metilpirrolidona (NMP), acetonitrilo, alcoholes, por ejemplo, etanol (EtOH), dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), y combinaciones de los mismos. En general, la concentración de molécula biológicamente relevante dentro del disolvente está entre aproximadamente 0,01 mg/ml y 200 mg/ml. Preferiblemente, la concentración de molécula biológicamente relevante está entre aproximadamente 0,05 mg/ml y 15 aproximadamente 100 mg/ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 20 mg/ml.

20 El disolvente puede eliminarse opcionalmente, por ejemplo, antes de la formación de liposomas, en la fase de liposoma y/o después de que se formen los cocleatos. Puede usarse cualquier método de eliminación de disolvente conocido. Por ejemplo, el disolvente puede eliminarse de la suspensión liposomal mediante flujo tangencial y/o filtración y/o diálisis, o de los cocleatos mediante lavado, filtración, centrifugación y/o diálisis. Los cocleatos pueden lavarse, por ejemplo, con tampón o agua, de manera óptima con calcio u otro catión.

25 Al utilizar los métodos de la presente invención, puede lograrse un amplio intervalo de razones de lípido con respecto a molécula biológicamente relevante. Razones diferentes pueden tener actividad biológica variable. La cantidad de molécula biológicamente relevante incorporada en los cocleatos puede variarse según se desee. La razón óptima lípido:molécula biológicamente relevante para un propósito deseado puede determinarse fácilmente. Los cocleatos pueden administrarse al huésped seleccionado como diana para determinar la naturaleza y magnitud de la respuesta biológica a los cocleatos administrados. Es evidente que la razón optimizada para un uso cualquiera puede oscilar desde una alta razón hasta una baja razón para obtener una cantidad de molécula biológicamente relevante máxima en los cocleatos. Todas las razones divulgadas en el presente documento son en p/p, a menos que se indique lo contrario. En una realización, la razón de lípido con respecto a molécula biológicamente relevante está entre aproximadamente 10.000:1 y 1000:1. Las razones en este intervalo pueden ser adecuadas cuando se desea administrar pequeñas cantidades de la molécula, (por ejemplo, en el caso de administración de agentes radiactivos o moléculas muy activas, raras o costosas). En otra realización, la razón está entre aproximadamente 35 8.000:1 y 4.000:1, por ejemplo, aproximadamente 6.000:1. Una razón de este tipo puede ser adecuada, por ejemplo, en el suministro de porfirinas. En aún otra realización, la razón está entre aproximadamente 5.000:1 y 50:1. En aún otra realización, la razón del lípido con respecto a la molécula biológicamente relevante está entre aproximadamente 20:1 y aproximadamente 0,5:1. En otra realización, la razón del lípido con respecto a la molécula biológicamente relevante está entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 10:1. Una razón de este tipo puede ser adecuada, por ejemplo, para el suministro de un agente antifúngico. En aún otra realización, la razón de lípido con respecto a la molécula biológicamente relevante es aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, o entre aproximadamente 1,5:1 y 3,5:1. Todos los intervalos y valores individuales entre aproximadamente 0,25:1 y aproximadamente 40.000:1 están dentro del alcance de la invención. Valores adicionales también están dentro del alcance de la invención. Las formulaciones de cocleato también pueden prepararse tanto con como sin moléculas de direccionamiento (por ejemplo, moléculas fusogénicas, tales como polipéptidos de la envoltura de virus Sendai), para dirigirse a células y/o tejidos específicos.

50 En algunas realizaciones, la molécula biológicamente relevante es hidrófoba. En otras, es anfifática. En todavía otras, es hidrófila y/o hidrosoluble.

Puede formarse una molécula biológicamente relevante hidrófoba encocleada dentro de cocleatos (por ejemplo, cocleatos de beta-caroteno) introduciendo una molécula biológicamente relevante hidrófoba en un liposoma en presencia de un disolvente de modo que la molécula biológicamente relevante hidrófoba se asocia con el liposoma, y precipitando el liposoma para formar una molécula-cocleato biológicamente relevante hidrófoba. En realizaciones particularmente preferidas, la carga de molécula biológicamente relevante en el cocleato (por ejemplo, hidrófoba, anfifática, hidrófila y/o hidrosoluble) es considerablemente mayor que la carga observada cuando se forman cocleatos usando métodos convencionales, es decir, aquellos descritos en la patente estadounidense n.º 5.994.318.

60 La formación de las composiciones de cocleato de la presente invención en los métodos anteriores implica cristalización de catión multivalente con lípidos cargados negativamente. Es evidente, por tanto, que todos los parámetros que rigen la cristalización, por ejemplo, temperatura, concentración lipídica, concentraciones de catión multivalente, velocidad de adición de cationes, pH y velocidad de mezclado, pueden utilizarse para regular la formación de cocleatos. En determinadas realizaciones, pueden crearse o ajustarse condiciones iónicas para afectar a la eficacia de la asociación y/o la encocleación de la molécula biológicamente relevante. Por ejemplo, aumentar la concentración de sal en una suspensión liposomal puede volver el medio menos acogedor para una molécula biológicamente relevante hidrófoba o anfifática, aumentando de ese modo la eficiencia de carga de cocleato y 65

liposoma. Las condiciones iónicas también pueden afectar a la estructura final del cocleato generado. Altas cargas de una molécula biológicamente relevante también pueden afectar a la estructura muy ordenada observada en cocleatos formados, por ejemplo, exclusivamente de calcio y fosfatidilserina. Además o alternativamente, pueden crearse o ajustarse condiciones de pH para afectar a la carga y estructura de los cocleatos resultantes. Tales variaciones pueden manipularlas fácilmente el médico experto usando no más que la presente memoria descriptiva y experimentación de rutina. Además, dado que un cocleato es muy estable termodinámicamente, una vez se desarrolla un método de formulación de cocleatos para un producto dado, el producto final puede elaborarse de manera predecible y fiable.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de elaboración de cocleatos anhidros con moléculas biológicamente relevantes protonizadas. El método incluye generalmente la etapa de poner en contacto un lípido cargado negativamente con una molécula biológicamente relevante protonizada y un catión de metal divalente. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, se cree que el lípido cargado negativamente forma una interacción iónica con la molécula biológicamente relevante catiónica protonizada. El catión de metal divalente precipita entonces el lípido y la molécula biológicamente relevante protonizada para formar un cocleato anhidro. Tales métodos se conocen bien en la técnica y se describen, al menos en la publicación de patente estadounidense 2007/0237814.

En otro aspecto, la presente invención se refiere generalmente a métodos de elaboración de cocleatos que incluyen un inhibidor de la agregación. El inhibidor de la agregación puede introducirse antes de, durante o después de la formación de cocleatos. Es decir, el inhibidor de la agregación puede añadirse a la disolución de lípido-molécula biológicamente relevante, a la disolución liposomal o al cocleato precipitado. Por ejemplo, en una realización, el inhibidor de la agregación se introduce en una suspensión liposomal de la que los cocleatos se formarán posteriormente (por ejemplo, mediante adición de cationes o diálisis). Es decir, el inhibidor de la agregación puede introducirse antes de la formación de liposomas, por ejemplo, puede añadirse a lípido seco antes de la suspensión o añadirse directamente a una suspensión liposomal, antes o después de la adición de una molécula biológicamente relevante. En tales realizaciones, los cocleatos pueden formarse inicialmente en el intervalo de tamaño deseado y después de eso evitarse la agregación mediante la presencia del inhibidor de la agregación.

En otras realizaciones, los métodos de la invención pueden incluir la etapa de introducir un inhibidor de la agregación en una composición de cocleato. Por ejemplo, el método puede incluir además formar cocleatos (antes de introducir el inhibidor de la agregación). El método puede incluir proporcionar cocleatos ya formados, por ejemplo, cocleatos obtenidos de un proveedor. El método puede incluir además la etapa de desagregar cocleatos añadiendo un inhibidor de la agregación a cocleatos agregados.

En todavía otras realizaciones, los cocleatos agregados pueden desagregarse usando métodos de desagregación alternativos, por ejemplo, homogenización, y puede introducirse un inhibidor de la agregación con el fin de evitar la reagregación. En aún otra realización, el inhibidor de la agregación puede introducirse durante la formación del cocleato, por ejemplo, puede añadirse con el catión o durante la diálisis. En una realización preferida, el inhibidor de la agregación se añade en una cantidad adecuada para modular el cocleato resultante al tamaño deseado.

El método puede incluir formar cocleatos con cualquiera o todos los componentes opcionales divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los cocleatos pueden incluir compuestos catiónicos adicionales, moléculas biológicamente relevantes protonizadas, lípidos no negativos y/o inhibidores de la agregación.

Cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede utilizarse para producir cualquiera desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 g de cocleatos en un lote. Puede preferirse un lote más pequeño en un entorno de laboratorio donde se desea la caracterización de cocleatos. Por otro lado, pueden preferirse lotes mayores en un entorno de fabricación donde se desea producción en masa. Preferiblemente, lotes mayores son de al menos 50 g, y más preferiblemente de al menos 75 g.

III. Métodos de la presente invención

En aún otro aspecto, la presente invención contempla métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratar un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno que puede tratarse con una o más composiciones de cocleato descritas en el presente documento.

Muchos acontecimientos de fusión de membrana que se producen de manera natural implican la interacción de calcio con fosfolípidos cargados negativamente (por ejemplo PS y fosfatidilglicerol). Las perturbaciones inducidas por calcio de membranas que contienen lípidos cargados negativamente, y los posteriores acontecimientos de fusión de membrana, son mecanismos importantes en muchos procesos de fusión de membrana naturales. Por tanto, los cocleatos pueden preverse como productos intermedios de fusión de membrana.

Un acontecimiento de fusión se produce entre la capa exterior del cocleato y la membrana celular, dando como resultado el suministro de material encocleado en el citoplasma de la célula diana. A medida que la membrana rica en calcio, muy ordenada, de un cocleato se aproxima en primer lugar a una membrana natural, se induce una

perturbación y un reordenamiento de la membrana celular, dando como resultado un acontecimiento de fusión entre la capa exterior del cocleato y la membrana celular. Esta fusión da como resultado el suministro de una pequeña cantidad del material encocleado en el citoplasma de la célula diana. El cocleato puede entonces liberarse de la célula y estar disponible para otro acontecimiento de fusión, o bien con la misma célula o bien con otra.

Además o alternativamente, particularmente con células fagocíticas activas, los cocleatos pueden absorberse por endocitosis y fusionarse desde dentro de la vesícula endocítica. Se ha demostrado que los cocleatos elaborados con cantidades traza de lípidos fluorescentes se unen y transfieren gradualmente lípidos a la membrana plasmática y membranas interiores de glóbulos blancos *in vitro*.

Los cocleatos son útiles para el suministro de una molécula biológicamente relevante a células, tejidos u organismos cultivados mediante una variedad de vías de administración. El término "suministro", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier medio de llevar o transportar una molécula biológicamente relevante a un huésped, un alimento, una formulación, una composición farmacéutica, o cualquier otro sistema, en el que la molécula biológicamente relevante mantiene al menos una parte de su actividad.

Los cocleatos pueden coadministrarse con un agente adicional. El segundo agente puede suministrarse en la misma preparación de cocleato, en una preparación de cocleato diferente mezclada con la preparación de cocleato de la invención, por separado en otra forma (por ejemplo, cápsulas o pastillas), o en un portador con la preparación de cocleato. Los cocleatos pueden incluir además una o más moléculas biológicamente relevantes adicionales, tales como otros fármacos, péptidos, nucleótidos (por ejemplo, ADN y ARN), antígenos, nutrientes, aromas y/o proteínas.

Las composiciones de cocleato de la presente invención también pueden incluir una molécula indicadora para su uso en ensayos de diagnóstico *in vitro*, que puede ser un fluoróforo, radiomarcador o agente de obtención de imágenes. Los cocleatos pueden incluir moléculas que dirigen la unión del cocleato a una diana celular específica, o promover la entrada selectiva en un tipo de célula particular.

Una ventaja de los cocleatos de la presente invención es la estabilidad de la composición, especialmente para encocleación potenciada de API hidrófilos. Los cocleatos pueden administrarse por cualquier vía, por ejemplo, mucosa o sistémica, sin preocupaciones. Los cocleatos pueden administrarse por vía oral o mediante instilación sin preocupaciones, así como por las vías más tradicionales, tales como oral, intranasal, intraocular, intrarrectal, intravaginal, intrapulmonar, tópica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, transdérmica, sistémica, intratecal (en el LCR), y similares. La aplicación directa a superficies mucosas es un medio de suministro atractivo hecho posible con los cocleatos. El suministro puede efectuarse mediante, por ejemplo, un pulverizador nasal o baño nasal o irrigación.

Otra ventaja de la presente invención es la capacidad de modular el tamaño de cocleato. La modulación del tamaño de los cocleatos y composiciones de cocleato cambia la manera en la que la molécula biológicamente relevante se absorbe por las células. Por ejemplo, en general, los cocleatos pequeños se absorben de manera rápida y eficaz en las células, mientras que los cocleatos mayores se absorben más lentamente, pero tienden a conservar la eficacia durante un periodo de tiempo más largo. Además, en algunos casos, los cocleatos pequeños son más eficaces que los cocleatos grandes en determinadas células, mientras que en otras células los cocleatos grandes son más eficaces que los cocleatos pequeños.

Los cocleatos y composiciones de cocleato también pueden administrarse a humanos y animales no humanos, tales como perros, gatos y animales de granja, en preparaciones de comida o bebida. Tales composiciones pueden introducirse en las composiciones de comida o bebida por el fabricante (por ejemplo, para complementar la comida con nutrientes), o por el consumidor (por ejemplo, cuando la composición de cocleato se vende por separado como un aditivo alimenticio). Por ejemplo, pueden incorporarse nutrientes y/o aromatizantes en comida de perro o gato, particularmente cuando tal nutriente y/o aromatizante es frágil y se descompone o pierde normalmente actividad cuando se expone a oxígeno y/o agua. Pueden añadirse cocleatos en cualquier fase en la preparación de comida para perro o gato, ya que los cocleatos son estables en condiciones de presión y temperatura extremas.

Otra ventaja de los cocleatos y composiciones de cocleato de la presente invención es su capacidad para reducir varios efectos secundarios no deseados. Varios fármacos actualmente en el mercado provocan malestar gastrointestinal y a menudo altos niveles de circulación en sangre conducen a toxicidad en varios órganos vitales. La ingestión de, por ejemplo, aspirina puede dar como resultado malestar epigástrico, náuseas y vómitos.

Otra ventaja de la presente invención es que los cocleatos pueden formularse para captación por células u órganos particulares. De manera convencional, a menudo se administran altos niveles de fármacos por vía intravenosa para obtener niveles moderados en los sitios de infección con el fin de combatir infecciones oportunistas. Esto puede provocar efectos secundarios no deseados, por ejemplo, en el caso de la vancomicina, pueden producirse exantemas maculosos, anafilaxis, flebitis y dolor en el sitio de inyección intravenosa, escalofríos, erupciones y fiebre. Además, la infusión intravenosa rápida puede provocar una variedad de síntomas, incluyendo reacciones eritematosas o urticariales, rubefacción, taquicardia e hipotensión, generalmente insuficiencia auditiva no permanente, ototoxicidad asociada con concentraciones excesivamente altas del fármaco en plasma y menos

comúnmente, nefrotoxicidad. Al emplear los cocleatos de la presente invención, los niveles de toxicidad pueden reducirse disminuyendo el fármaco libre en la sangre circulante. Además, la molécula biológicamente relevante puede suministrarse directamente al sitio de infección, lo que puede reducir o eliminar la incidencia de malestar gastrointestinal.

5 Por ejemplo, los aminoglucósidos se absorben muy mal en el tubo gastrointestinal. Menos del 1% de la dosis se absorbe normalmente tras la administración o bien oral o bien rectal. Además, se encuentran concentraciones inadecuadas de aminoglucósidos en el líquido cefalorraquídeo. Además, los fármacos no se inactivan en el intestino, y se excretan de manera relativamente rápida del riñón normal, es decir, se eliminan de manera cuantitativa en las heces. La administración oral o rectal a largo plazo, sin embargo, puede dar como resultado la acumulación de aminoglucósidos hasta concentraciones tóxicas en pacientes con insuficiencia renal. La instilación de estos fármacos en el cuerpo con superficies serosas puede dar como resultado una rápida absorción y toxicidad inesperada, es decir, bloqueo neuromuscular. De manera similar, la intoxicación puede producirse cuando se aplican aminoglucósidos por vía tópica durante largos periodos de tiempo a grandes heridas, quemaduras o úlceras cutáneas, particularmente si hay insuficiencia renal.

Además, debido a su naturaleza polar, los aminoglucósidos se excluyen en gran medida de la mayoría de células, del sistema nervioso central y del ojo. Las concentraciones de aminoglucósidos administrados convencionalmente en secreciones y tejidos son bajas. Se encuentran, sin embargo, altas concentraciones en la corteza renal y en la endolinfa y perilinfa del oído interno; que se cree que contribuyen a la nefrotoxicidad y ototoxicidad provocadas por estos fármacos. Aunque son agentes usados ampliamente, la toxicidad grave es una limitación principal a la utilidad de los aminoglucósidos. Concentraciones constantes de fármaco en plasma por encima de un nivel crítico, que se manifiesta por concentraciones séricas mínimas elevadas, se correlaciona con toxicidad en seres humanos. Los aminoglucósidos tienen el potencial de producir toxicidad vestibular, coclear y renal reversible o irreversible. Estos efectos secundarios complican el uso de estos compuestos y hacen que su administración adecuada sea difícil.

Los cocleatos y composiciones de cocleato de la presente invención pueden administrarse a animales, incluyendo tanto animales humanos como no humanos. Puede administrarse a animales, por ejemplo, en agua o alimento para animales. Por ejemplo, pueden administrarse cocleatos antibióticos de la presente invención a aves de corral y otros animales de granja, incluyendo los rumiantes y cerdos, para controlar la infección o para promover el crecimiento o la producción de leche. Entre varios estados que pueden tratarse con estos agentes está la enteritis, una enfermedad que puede provocar graves pérdidas económicas a los productores ganaderos. La enteritis se produce en gallinas, cerdos, bovinos y ovejas, y está atribuida principalmente a bacterias anaerobias, particularmente *Clostridium perfringens*. La enterotoxemia en rumiantes, cuyo ejemplo es la "enfermedad de comer en exceso" en ovejas, es un estado producido mediante infección por *C. perfringens*. El tratamiento de tales estados también se abarca, por tanto, dentro de los métodos de la presente invención.

a. Métodos profilácticos

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o trastorno que puede tratarse con al menos una molécula biológicamente relevante, por ejemplo, una proteína, un péptido pequeño, un antiviral, un anestésico, un antiinfeccioso, un antifúngico, un anticancerígeno, un inmunodepresor, un antiinflamatorio esteroideo, un antiinflamatorio no esteroideo, un tranquilizante, un agente mucolítico, un dilatador, un vasoconstrictor, un descongestivo, un inhibidor de leucotrieno, un anticolinérgico, un antihistamínico o un agente vasodilatador. Los sujetos en riesgo de una enfermedad o un estado que pueden tratarse con los agentes mencionados en el presente documento pueden identificarse mediante, por ejemplo, cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos para los expertos en la técnica. La administración de un agente profiláctico puede producirse antes de la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad o trastorno, de modo que la enfermedad o trastorno se previene o, alternativamente, se retrasa en su progresión.

b. Métodos terapéuticos

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de administración de una composición de cocleato con fines terapéuticos. En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar un sujeto que se beneficiaría de la administración de una composición de la presente invención. Cualquier indicación terapéutica que se beneficiaría de una composición de cocleato de la invención puede tratarse por los métodos de la presente invención. La presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto en riesgo de o que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse con una o más moléculas biológicamente relevantes. El método incluye la etapa de administrar al sujeto una composición de la invención, de modo que la enfermedad o trastorno se previene, se mejora, se termina o se retrasa en su progresión. La enfermedad o trastorno puede ser cualquiera de las enfermedades o trastornos comentados en el presente documento.

65 Las composiciones de la invención pueden administrarse solas a un sujeto o en combinación con una segunda terapia tal como se describió anteriormente. Las composiciones de la invención pueden administrarse a un sujeto antes de, al mismo tiempo o después de que se administre una segunda terapia.

Los agentes terapéuticos pueden someterse a prueba en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, las composiciones de cocleato de la presente invención pueden usarse en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con dicho agente. Alternativamente, puede usarse un agente terapéutico en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de un agente de este tipo. Por ejemplo, puede usarse un agente en un modelo animal para determinar la eficacia, la toxicidad o los efectos secundarios del tratamiento con un agente de este tipo. Alternativamente, puede usarse un agente en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de un agente de este tipo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” o “que trata”, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico (por ejemplo, antibióticos encocleados por composiciones de cocleato de la presente invención) a un paciente, o aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido o línea celular aislado de un paciente, que tiene una enfermedad o trastorno, un síntoma de enfermedad o trastorno o una predisposición hacia una enfermedad o trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, paliar, mejorar o afectar la enfermedad o trastorno, los síntomas de la enfermedad o trastorno, o la predisposición hacia la enfermedad o trastorno. El término “tratado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la enfermedad o trastorno que se está curando, sanando, aliviando, mitigando, alterando, remediando, paliando, mejorando o afectando. Por ejemplo, determinados métodos de tratamiento de la presente invención contemplan la administración de cocleatos antiinflamatorios, de modo que la inflamación se reduce o alivia. Otros métodos de tratamiento de la presente invención incluyen la administración de cocleatos antifúngicos, de modo que la infección fúngica se mitiga o se remedia.

Los términos “curar”, “sanar”, “aliviar”, “mitigar”, “alterar”, “remediar”, “paliar”, “mejorar” y “afectar” se evalúan en cuanto a un control adecuado o apropiado. Un “control adecuado” o “control apropiado” es cualquier control o patrón familiar para un experto habitual en la técnica útil con fines de comparación. En una realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, un nivel, un rasgo, una característica, una propiedad, etc., determinado antes de la administración de un cocleato que encoclea una molécula biológicamente relevante, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, puede determinarse el número de unidades formadoras de colonias antes de administrar una composición de cocleato de la presente invención a un huésped. En otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, un nivel, un rasgo, una característica, una propiedad, etc., determinado en un sujeto, por ejemplo, un sujeto control o normal que presenta, por ejemplo, rasgos normales. En aún otra realización, un “control adecuado” o “control apropiado” es un valor, un nivel, un rasgo, una característica, una propiedad, etc., definido previamente.

Los métodos de la presente invención incluyen métodos de administración de una molécula biológicamente relevante a un huésped, en la que la molécula biológicamente relevante se asocia con un cocleato o composición de cocleato de la invención. Los cocleatos y composiciones de cocleato de la presente invención pueden administrarse por vía oral, nasal, tópica, intravenosa, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal o parenteral.

La presente invención proporciona un método para tratar un sujeto que se beneficiaría de la administración de una composición de la presente invención. Cualquier indicación terapéutica que se beneficiaría de una molécula biológicamente relevante, por ejemplo, un fármaco o nutriente, puede tratarse por los métodos de la invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de tratar un sujeto en riesgo de o que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse con, por ejemplo, una proteína, un péptido pequeño, un polinucleótido bioactivo, un antibiótico, un antiviral, un anestésico, antipsicótico, un antiinfeccioso, un antifúngico, un anticancerígeno, un inmunodepresor, un inmunostimulante, un antiinflamatorio esteroideo, un antiinflamatorio no esteroideo, un antioxidante, un antidepresivo que puede derivarse de manera sintética o natural, una sustancia que apoya o potencia la función mental o inhibe el deterioro mental, un anticonvulsivo, un inhibidor de la VIH proteasa, un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleófilo, una citocina, un tranquilizante, un agente mucolítico, un dilatador, un vasoconstrictor, un descongestivo, un inhibidor de leucotrieno, un anticolinérgico, un antihistamínico, un agente modulador del metabolismo de lípidos de colesterol o un agente vasodilatador. El método incluye la etapa de administrar al sujeto una composición de cocleato de la invención, de modo que se trata la enfermedad o trastorno. La enfermedad o trastorno puede ser, por ejemplo, inflamación, dolor, infección, infección fúngica, infección bacteriana, infección viral, trastornos parasitarios, un trastorno inmunitario, trastornos genéticos, trastornos degenerativos, cáncer, trastornos proliferativos, obesidad, depresión, pérdida de peso, impotencia, hipertensión, hipotensión, demencia, demencia senil, o malnutrición, linfoma y leucemia aguda y crónica, sarcoma, adenoma, carcinomas, cánceres epiteliales, cáncer de células pequeñas, cáncer de células no pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, cáncer biliar, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de útero, melanoma, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer de esófago, cáncer gástrico, mesotelioma, glioma, glioblastoma, adenomas pituitarios, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo (TOC), trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, trastornos celulares proliferativos, trastornos de la coagulación sanguínea, disfibrinogenemia y hemofilia (A y B), trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Grave, rechazo a trasplante alogénico, espondilitis anquilosante, psoriasis, escleroderma, uveítis, eccema, trastornos dermatológicos, hiperlipidemia, hiperglucemia e hipercolesterolemia.

Las composiciones de cocleato de la presente invención también pueden usarse para promover una mayor salud o calidad de vida, por ejemplo, limitar la captación de colesterol o regular el metabolismo lipídico, la ganancia de peso, el hambre, el envejecimiento o el crecimiento. También pueden tratarse efectos cosméticos tales como reducción de arrugas, crecimiento capilar, pigmentación o trastornos dermatológicos. Los cocleatos también pueden tratar una enfermedad hereditaria tal como fibrosis quística o distrofia muscular.

Las composiciones de cocleato de la presente invención pueden usarse para tratar una variedad de inflamaciones, incluyendo dolor de cabeza, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, gota aguda, daño de los tejidos blandos agudo o crónico asociado con, por ejemplo, una lesión deportiva, epicondilitis, bursitis, tendinitis, dolor de espalda agudo o crónico, tal como un disco herniado, síndrome del túnel carpiano, glomerulonefritis, carditis, colitis ulcerosa, asma, sepsis y fascitis plantar. Las composiciones de cocleato de la presente invención también pueden usarse para mitigar el dolor resultante de cirugía u otro procedimiento médico. Las composiciones de cocleato de la presente invención pueden usarse adicionalmente para tratar una variedad de infecciones fúngicas, incluyendo candida, por ejemplo, candidiasis, tiña, por ejemplo, pie de atleta, pitiriasis, candidosis, meningitis criptocócica, histoplasmosis y blastomicosis.

Las composiciones de cocleato de la presente invención también pueden usarse para tratar una variedad de infecciones bacterianas, incluyendo, pero sin limitarse a, infecciones de las vías respiratorias bajas de moderadas a graves, infecciones cutáneas, infecciones de las vías biliares, infecciones óseas, profilaxis antibiótica, enterocolitis pseudomembranosa, infecciones del sistema nervioso central (por ejemplo, meningitis y ventriculitis), infecciones intraabdominales (por ejemplo, peritonitis), neumonía, septicemia, infecciones de los tejidos blandos, sepsis neutropénica, infecciones articulares, endocarditis infecciosa e infecciones de las vías urinarias.

Las bacterias a modo de ejemplo que pueden tratarse con la preparación antibiótica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, micobacterias tales como *Mycobacterium avium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* del grupo D, *Clostridium perfringens*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Debido a que la residencia intracelular de agentes infecciosos puede complicar el tratamiento, una cura completa puede requerir la erradicación de todas las bacterias intracelulares. Por tanto, un enfoque terapéutico que aumente la concentración de antibiótico intracelular puede mejorar la destrucción bactericida y garantizar la eliminación completa de la infección.

En una realización preferida, los cocleatos antibacterianos de la presente invención tienen la capacidad de reducir varias colonias bacterianas en al menos el 10%. Más preferiblemente, los cocleatos antibacterianos pueden reducir el número de colonias bacterianas en al menos el 25% e incluso más preferiblemente en el 50%, el 75%, el 85%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99,5%, el 99,9% o el 100%. Todos los intervalos y valores individuales que se sitúan entre estos intervalos y valores están dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también proporciona un medio para tratar una variedad de infecciones fúngicas, incluyendo pero sin limitarse a, asma, rinosinusitis crónica, sinusitis fúngica alérgica, micetoma sinusal, mucositis inducida por hongos no invasiva, mucositis intestinal inducida por hongos no invasiva, otitis media crónica, colitis crónica, enfermedades intestinales inflamatorias, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, candidemia, abscesos intraabdominales, peritonitis, infecciones del espacio pleural, candidiasis esofágica y aspergilosis invasiva. Los hongos a modo de ejemplo que pueden tratarse usando composiciones de cocleato antifúngicas de la presente invención incluyen, sin limitación, *Absidia*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Alternaria*, *Basidiobolus*, *Bipolaris*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lypolitica*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium*, *Conidiobolus*, *Cunninhamella*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Malbranchea*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Sporothrix*, *Acremonium*, *Arachniotus citrinus*, *Aurobasidium*, *Beauveria*, *Chaetomium*, *Chyrosporium*, *Epicoccum*, *Exophylla jeanselmei*, *Geotrichum*, *Oidiodendron*, *Phoma*, *Pithomyces*, *Rhinochlamydia*, *Rhodoturula*, *Sagrahamala*, *Scolecobasidium*, *Scopulariopsis*, *Ustilago*, *Trichoderma* y cigomicetos.

En una realización preferida, los cocleatos antifúngicos de la presente invención tienen la capacidad de reducir las unidades formadoras de colonias fúngicas (UFC) en al menos el 10%. Más preferiblemente, los cocleatos de equinocandina pueden reducir las UFC en al menos el 25% e incluso más preferiblemente en el 50%, el 75%, el 85%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99,5%, el 99,9% o el 100%. Todos los intervalos y valores individuales que se sitúan entre estos intervalos y valores están dentro del alcance de la presente invención. La reducción de unidades formadoras de colonias puede ser *in vivo* o *in vitro*. El huésped de la infección fúngica puede ser un animal humano o no humano.

Los métodos anteriores pueden usarse en ausencia de otro tratamiento, o en combinación con otros tratamientos. Tales tratamientos pueden iniciarse antes de, de manera concomitante con o después de la administración de las composiciones de la presente invención. Por consiguiente, los métodos de la invención pueden incluir además la

etapa de administrar un segundo tratamiento, tal como por ejemplo, un segundo tratamiento para la enfermedad o trastorno o para paliar los efectos secundarios de otros tratamientos. Tal segundo tratamiento puede incluir, por ejemplo, radiación, quimioterapia, transfusión, operaciones (por ejemplo, escisión para extirpar tumores) y terapia génica. Además o alternativamente, el tratamiento adicional puede incluir la administración de fármacos para tratar adicionalmente la enfermedad o para tratar un efecto secundario de la enfermedad u otros tratamientos (por ejemplo, fármacos contra las náuseas).

Con respecto a los métodos de tratamiento tanto profilácticos como terapéuticos, tales tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. "Farmacogenómica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la aplicación de tecnologías genómicas tales como secuenciamiento genómico, genética estadística y análisis de la expresión génica de fármacos en desarrollo clínico y en el mercado.

Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un paciente determinan su respuesta a un fármaco (por ejemplo, el "fenotipo de respuesta al fármaco" o "genotipo de respuesta al fármaco"). Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona métodos para adaptar el tratamiento profiláctico o terapéutico de un individuo según el genotipo de respuesta al fármaco de ese individuo. La farmacogenómica permite a un facultativo o médico dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a los pacientes que se beneficiarán más del tratamiento y evitar el tratamiento de pacientes que experimentarán efectos secundarios tóxicos relacionados con los fármacos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad necesaria o suficiente para producir la respuesta fisiológica deseada. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño y el peso del sujeto, o el compuesto particular. La cantidad eficaz puede determinarse considerando la toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan grandes índices terapéuticos. Si bien pueden usarse compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado al diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no afectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular una variedad de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación usada y la vía de administración usada. Para cualquier composición usada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluya la CE_{50} (es decir, la concentración de la composición de prueba que logra una respuesta semimáxima) tal como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

IV. Composiciones farmacéuticas

La invención se refiere a los usos de las composiciones de cocleato de la invención para tratamientos profilácticos y terapéuticos tal como se describe en el presente documento. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones normalmente comprenden las composiciones de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para principios farmacéuticamente activos se conoce bien en la técnica.

Además puede estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulgentes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de desmoldeo, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables, que también pueden estar presentes en formulaciones de compuestos terapéuticos de la invención, incluyen antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfatocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Además, la presente invención puede incluir además uno o más agentes adicionales, incluyendo agua, agentes antimicrobianos, agentes plastificantes, agentes aromatizantes, tensioactivos, agentes estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes espesantes, agentes aglutinantes, agentes colorantes, edulcorantes, fragancias, y similares.

5 Los agentes antimicrobianos adecuados incluyen triclosán, cloruro de cetilpiridio, bromuro de domifeno, sales de amonio cuaternario, compuestos de zinc, sanguinarina, fluoruros, alexidina, octonidina, EDTA y aceites esenciales tales como timol, salicilato de metilo, mentol y eucaliptol.

10 Los agentes plastificantes adecuados incluyen, por ejemplo, polioles tales como azúcares, alcoholes de azúcar o polietilenglicoles (PEG), urea; glicol, propilenglicol, citrato de trietilo, ftalato de dibutilo o dimetilo, monoacetina, diacetina o triacetina.

15 Los tensioactivos adecuados incluyen ácido plurónico, laurilsulfato de sodio, mono y diglicéridos de ácidos grasos y ésteres de polioxietilensorbitol, tales como, Atmos 300 y polisorbato 80. Los agentes estabilizantes adecuados incluyen goma xantana, goma de algarrobo, goma guar y carragenano. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen estearato de trietanolamina, compuestos de amonio cuaternario, goma arábica, gelatina, lecitina, bentonita, Veegum, y similares. Los agentes espesantes adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, y similares. Los agentes aglutinantes adecuados incluyen almidón.

20 Los edulcorantes adecuados que pueden incluirse son aquellos bien conocidos en la técnica, incluyendo edulcorantes tanto naturales como artificiales. Los edulcorantes adecuados incluyen agentes edulcorantes solubles en agua tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; edulcorantes artificiales solubles en agua tales como sales de sacarina solubles, sales de ciclamato o la forma ácida libre de la sacarina, y similares; edulcorantes basados en dipéptidos, tales como edulcorantes derivados de ácido L-aspártico; edulcorantes solubles en agua
25 derivados de edulcorantes solubles en agua que se producen de manera natural, tales como un derivado clorado de azúcar común (sacarosa), conocido bajo la descripción del producto de sucralosa; y edulcorantes a base de proteínas como *thaumatococcus danielli* (taumatina I y II).

30 En general, se utiliza una cantidad eficaz de edulcorante auxiliar para proporcionar el nivel de dulzura deseado para una composición particular, y esta cantidad variará con el edulcorante seleccionado. Esta cantidad será normalmente del 0,01% a aproximadamente el 10% en peso de la composición cuando se usa un edulcorante fácilmente extraíble.

35 Los aromatizantes que pueden usarse incluyen aquellos conocidos por el experto en la técnica, tales como aromas naturales y artificiales. Estos aromatizantes pueden elegirse entre aceites de aromas sintéticos y productos aromáticos aromatizantes, y/o aceites, oleorresinas y extractos derivados de plantas, hojas, flores, frutas, etc., y combinaciones de los mismos. Los aceites de aromas representativos incluyen: aceite de hierbabuena, aceite de canela, aceite de menta piperita, aceite de clavo, aceite de laurel, aceite de tomillo, aceite de hoja de cedro, aceite de nuez moscada, aceite de salvia y aceite de almendras amargas. También son útiles los aromas de frutas
40 artificiales, naturales o sintéticas tales como vainilla, chocolate, café, cacao y aceite cítrico, y esencias de frutas. Estos aromatizantes pueden usarse individualmente o en mezcla. También pueden usarse aromatizantes tales como aldehídos y ésteres que incluyen acetato de cinamilo, cinamaldehído, citral, acetato de dietilo, acetato de dihidrocarvilo, formiato de eugenilo, p-metilanol, etc. Generalmente, puede usarse cualquier aromatizante o aditivo alimentario, tal como los descritos en Chemicals Used in Food Processing, publicación 1274 de The National
45 Academy of Sciences, páginas 63-258.

50 La cantidad de aromatizante usada es normalmente una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo de aroma, el aroma individual y la intensidad deseada. Por tanto, la cantidad puede variar para obtener el resultado deseado en el producto final. Dichas variaciones están dentro de las capacidades de los expertos en la materia sin la necesidad de una experimentación excesiva.

55 Las composiciones de la presente invención también pueden contener agentes colorantes o colorantes. Los agentes colorantes se usan en cantidades eficaces para producir el color deseado. Los agentes colorantes útiles en la presente invención incluyen pigmentos tales como dióxido de titanio, que pueden incorporarse en cantidades de hasta aproximadamente el 5% en peso, y preferiblemente menos de aproximadamente el 1% en peso. Los colorantes también pueden incluir colorantes alimentarios naturales y tintes adecuados para aplicaciones en alimentos, fármacos y cosméticos. Estos colorantes se conocen como lacas y tintes FD&C. Puede encontrarse una relación completa de todos los tintes FD&C y D&C y sus correspondientes estructuras químicas en la Kirk-Othmer
60 Encyclopedia of Chemical Technology, volumen 5, páginas 857-884.

65 Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del 100%, esta cantidad oscilará desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 99% de

principio activo, preferiblemente desde aproximadamente el 5% hasta aproximadamente el 70%, lo más preferiblemente desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 30%.

5 Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar una composición de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima una composición de la presente invención con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

10 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, cachets, píldoras, comprimidos, cápsulas de gel, sustancias cristalinas, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, gel, líquido parcial, pulverizador, nebulosas, niebla, vapor atomizado, aerosol, tintura, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) o como enjuagues bucales y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de una composición de la presente invención como un principio activo. Una composición de la presente invención también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

20 En las formas de dosificación sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), el principio activo se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, o cualquiera de los siguientes: cargas o extendedores, como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa o goma arábica; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes colorantes.

25 En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de tamponamiento. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden usarse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

35 Se puede hacer un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes accesorios. Los comprimidos fabricados por compresión pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de sodio de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla de la composición en polvo humedecida con un diluyente líquido inerte.

40 Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden marcarse o prepararse opcionalmente con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímeros, liposomas o microesferas.

50 Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso.

55 Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libere solo el/los principio(s) activo(s), o preferentemente, estén en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

60 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulgentes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen,

65

oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrrlico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

5 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

10 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración rectal o vaginal pueden presentarse en forma líquida o de aerosol, o como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólida a temperatura ambiente, pero líquida a temperatura corporal y, por tanto, se derretirá en el recto o la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo. Las formas líquidas o en aerosol incluyen, pero no se limitan a, geles, pastas, pomadas, unguentos, cremas, disoluciones, suspensiones, líquidos parciales, pulverizadores, nebulosas, nieblas, vapores atomizados y tinturas. Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador que contienen los portadores que se conocen en la técnica como apropiados.

20 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención para administración nasal pueden estar en forma sólida, líquida o en aerosol (por ejemplo, polvo, sustancia cristalina, gel, pasta, pomada, unguento, crema, disolución, suspensión, líquido parcial, pulverizador, nebulosas, irrigante, lavado, niebla, vapor atomizado o tintura).

25 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de una composición de la presente invención incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalatorios. La composición puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda requerirse.

30 Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de una composición de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

35 Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de una composición de la presente invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propelentes habituales, como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

40 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de una composición de la presente invención al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando la composición en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también pueden usarse para aumentar el flujo de la composición a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse o bien proporcionando una membrana que controla la velocidad o bien dispersando la composición en una matriz polimérica o gel.

45 Las formulaciones oftálmicas, pomadas para ojos, polvos, disoluciones y similares también están dentro del alcance de la presente invención.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden un coceleato o una composición de coceleato de la invención en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor o agentes de suspensión o espesantes previstos.

55 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

60 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como

azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

5 En algunas realizaciones, tales adyuvantes pueden ser inmunomoduladores que pueden añadirse a las composiciones de la presente invención para estimular una respuesta inmunitaria. El inmunomodulador puede incluir proteínas de envoltura derivadas de virus humanos o animales, oligonucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos CpG, o puede ser de naturaleza química. Los inmunomoduladores químicos específicos incluyen, pero no se limitan a, citocinas, quimiocinas y linfocinas, que incluyen, pero no se limitan a, interferón alfa, interferón gamma e interleucina 12. Los ejemplos de virus animales adecuados como fuente de proteína de envoltura incluyen, pero no se limitan a, virus de las siguientes familias: *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Coronaviridae*, *Deltaviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Rhabdoviridae*, *Retroviridae*, *Poxviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae* y *Togaviridae*. Las proteínas de envoltura del virus de la gripe, del virus de la enfermedad de Newcastle y del virus vacuna, y el virus Sendai también se incluyen en la presente invención.

15 En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable disminuir la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene mala solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando una composición de la invención en la cantidad deseada en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando la composición en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo de las composiciones de cocleato de la invención más cualquier componente adicional deseado de una disolución previamente filtrada estéril de los mismos.

50 Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de los compuestos objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-policlicólido. Dependiendo de la razón de fármaco con respecto a polímero, y la naturaleza del polímero particular usado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

55 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, la composición puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador fluido para usar como enjuague bucal, en el que la composición en el portador fluido se aplica por vía oral y se agita y expectora o traga. Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares, pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato o esterotes de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como

menta piperita, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

5 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un pulverizador de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

10 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica.

15 Las composiciones de la invención también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

20 En una realización, las composiciones de la invención se preparan con portadores que protegerán la composición contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo los liposomas que seleccionan como diana células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.522.811.

30 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de una composición calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas de unidad de dosificación de la invención se dicta por y depende directamente de las características únicas de la composición y del efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicha composición para el tratamiento de individuos.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente junto con uno o más compuestos o composiciones adicionales e instrucciones de uso. Por ejemplo, la invención también proporciona productos farmacéuticos envasados que contienen dos agentes, cada uno de los cuales ejerce un efecto terapéutico cuando se administra a un sujeto que lo necesita. Una composición farmacéutica también puede comprender un tercer agente, o incluso aún más agentes, en el que el tercer (y cuarto, etc.) agente puede ser otro agente contra el trastorno, tal como un tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, un fármaco contra el cáncer y/o quimioterapia) o un cóctel contra el VIH. En algunos casos, los agentes individuales pueden envasarse en recipientes separados para la venta o entrega al consumidor. Los agentes de la invención pueden suministrarse en una disolución con un disolvente apropiado o en una forma libre de disolvente (por ejemplo, liofilizada). Los componentes adicionales pueden incluir ácidos, bases, agentes de tamponamiento, sales inorgánicas, disolventes, antioxidantes, conservantes o agentes de quelación de metales. Los componentes adicionales del kit están presentes como composiciones puras, o como disoluciones acuosas u orgánicas que incorporan uno o más componentes adicionales del kit. Cualquiera o todos los componentes del kit opcionalmente comprenden además tampones.

55 La presente invención también incluye productos farmacéuticos envasados que contienen un primer agente en combinación con (por ejemplo, mezclado con) un segundo agente. La invención también incluye un producto farmacéutico que comprende un primer agente envasado con instrucciones para usar el primer agente en presencia de un segundo agente o instrucciones para usar el primer agente en un método de la invención. La invención también incluye un producto farmacéutico que comprende un segundo agente o agentes adicionales envasados con instrucciones para usar el segundo agente o agentes adicionales en presencia de un primer agente o instrucciones para usar el segundo agente o agentes adicionales en un método de la invención. Alternativamente, el producto farmacéutico envasado puede contener al menos uno de los agentes y el producto puede promoverse para su uso con un segundo agente.

65 En aún otro aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación de cocleatos y/o composiciones de cocleatos de la invención. El artículo de fabricación incluye material de envasado y un lípido contenido dentro del

material de envasado. El material de envasado incluye una etiqueta o un prospecto que indica el uso del lípido para formar cocleatos o composiciones de cocleatos de la invención. El artículo de fabricación puede incluir además instrucciones o pautas para la formación de cocleatos o composiciones de cocleatos de la invención, por ejemplo, mezclando una molécula biológicamente relevante con un disolvente y haciéndola gotear en una disolución de los lípidos. Opcionalmente, el artículo de fabricación puede incluir un disolvente, una molécula biológicamente relevante, un catión multivalente (por ejemplo, calcio y/o magnesio), una molécula de control biológicamente relevante y/o un agente quelante (por ejemplo, EDTA). El artículo de fabricación puede incluir además otros componentes o aparatos que pueden usarse para fabricar las composiciones de la presente invención.

10 Las instrucciones y/o pautas pueden incluir generalmente una o más de las siguientes declaraciones:

1. Preparar una suspensión liposomal mezclando vigorosamente los lípidos apropiados según la presente invención en agua o tampón.

15 2. Monitorizar las concentraciones de lípidos: la baja concentración requerirá un gran volumen de tampón para formular una cantidad adecuada de producto final, y una alta concentración puede producir grandes agregados de cocleato después de la adición de calcio.

20 3. Determinar experimentalmente si usar agua o una solución tamponada: la presencia de sales y el pH de la suspensión pueden afectar a la formación del producto intermedio de molécula-liposoma biológicamente relevante que depende de las propiedades de la molécula biológicamente relevante.

25 4. Opcionalmente, filtrar o realizar otros procedimientos habituales para preparar liposomas de tamaño definido y/o para esterilizar la suspensión.

5. Preparar una disolución de molécula biológicamente relevante con un disolvente apropiado: pueden usarse muchos disolventes en este procedimiento, por ejemplo, DMSO.

30 6. Añadir la disolución de molécula-disolvente biológicamente relevante, preferiblemente gota a gota, a la suspensión de liposomas mezclando vigorosamente.

35 7. Determinar experimentalmente la tasa óptima de adición y la velocidad de mezclado: debe producirse una suspensión de liposomas de moléculas biológicamente relevantes esencialmente libres de moléculas biológicamente relevantes no encocleadas cuando se observa mediante microscopio óptico.

8. Calcular la cantidad de calcio que se añadirá suponiendo un mol de calcio por cada dos moles de lípidos, y añadir calcio adicional para llevar el tampón a entre 2 y 6 mM.

40 9. Inducir la formación de cocleato mediante la adición de una sal de calcio. La sal puede añadirse como una disolución, por ejemplo, cloruro de calcio 0,1 M, o puede añadirse lentamente como una sal de calcio sólida, por ejemplo, cloruro de calcio, mezclando vigorosamente.

45 10. Si la presencia de disolvente en el tampón no es deseada, recoger opcionalmente los cocleatos de moléculas biológicamente relevantes, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, y resuspenderlos en un medio apropiado. La asociación de iones de calcio con PS es fácilmente reversible, por tanto, para permanecer intactos y en su estado cristalino, las formulaciones de cocleato pueden resuspenderse en un medio que contenga al menos iones de calcio de 1 a 2 mM.

50 11. Opcionalmente, evaluar la calidad de la formulación de cocleato. La presencia de suficientes iones de calcio inicia y mantiene la estructura del cocleato. Un método para evaluar la calidad de una formulación de cocleato es la visualización de los liposomas que se producen al eliminar los iones de calcio de un cristal de cocleato. Esto puede lograrse usando el microscopio óptico. Puede visualizarse una alícuota de una suspensión de cocleato de molécula biológicamente relevante mediante microscopía de contraste de fase con un aumento de 1000x. Puede añadirse una pequeña cantidad de una disolución concentrada de un agente quelante, por ejemplo, EDTA, al borde del cubreobjetos, llegando así a la muestra a través de la acción capilar. Un producto de cocleato de alta calidad se abrirá en liposomas intactos al entrar en contacto con el agente quelante de calcio. Cuando se usa EDTA como agente quelante, el pH de la disolución de EDTA debe ser de aproximadamente pH 9,5. Los cocleatos no se convertirán en liposomas a un pH por debajo de 6,5. Si se usan disoluciones de EDTA a pH 7,4, la liberación de iones de hidrógeno al unirse el calcio a los grupos acetato del agente quelante disminuye el pH de la disolución e inhibe la conversión de cocleato a liposomas.

65 La elección del disolvente y otros materiales, la tasa óptima de adición de gota a gota, la velocidad de mezclado, la cantidad de calcio, etc., puede determinarse fácilmente por el médico experto empleando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Por ejemplo, puede proporcionarse una suspensión de liposomas ya preparada, puede usarse una combinación de disolventes, puede usarse calcio en exceso para evitar el cálculo de calcio, pueden usarse cationes alternativos o adicionales, etc.

Ejemplos

Ejemplo 1: Formulaciones de aminoglucósido para administración y suministro oral

- 5 La infección por *Mycobacterium avium* (Ma) es común en pacientes inmunodeprimidos e individuos con estados pulmonares crónicos. El tratamiento eficaz de la infección por Ma se limita a unos pocos compuestos, y el uso de amikacina está restringido por la vía de administración (intravenosa o intramuscular) y la toxicidad.
- 10 Los cocleatos son precipitados estables, cristalinos y anhidros compuestos de fosfatidilserina (PS) y calcio (Ca), con una estructura multiestratificada única que consiste en una lámina bicapa lipídica sólida, continua y grande enrollada en una espiral o como láminas apiladas. Los cocleatos reducen la toxicidad de los fármacos y media la administración oral de fármacos que actualmente solo están disponibles como formulaciones inyectables.
- 15 Las formulaciones de cocleato de amikacina (Amkcch) se optimizaron para la eficiencia de la encocleación de amikacina y el tamaño de partícula variando el tipo de PS usado, la razón PS:fármaco, la razón PS:Ca y la concentración de NaCl. La eficacia de Amkcch contra infecciones por Ma intracelulares se evaluó *in vitro* usando macrófago peritoneal de ratón infectado con cepas de *M. avium* MAC 101 o MAC 109. Se sembraron células de macrófagos Raw 264.7 peritoneales de ratón (Mo) a 10^5 células/pocillo. Se infectaron monocapas de Mo a una razón de 1:10 durante 1 h y se eliminaron las bacterias extracelulares. Se trataron las monocapas con amikacina libre y/o preparaciones de cocleato durante 4 días y se determinó el número de bacterias intracelulares. Los ensayos se repitieron tres veces.
- 20 Las cepas de Ma de control no tratadas crecieron dentro de Mo desde $3,8 \pm 10^5$ hasta $4,9 \pm 10^6$. Se destruyeron Ma dentro de Mo tratado con amikacina libre (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) hasta $6,1$ y $3,4 \pm 10^4$ bacterias, respectivamente. Los Amkcch optimizados (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) demostraron eficacia mejorada más de 10 veces, reduciendo el recuento bacteriano a $3,9$ y $1,7 \pm 10^3$ bacterias dentro de Mo ($p < 0,05$ comparado con amikacina libre).
- 25 Las preparaciones de cocleato de amikacina mostraron actividad mejorada y significativa contra cepas de Ma en macrófagos, lo que sugiere que los cocleatos alcanzaron una concentración intracelular superior durante más tiempo que la amikacina libre. Los experimentos en animales están en curso.
- 30 Específicamente, se deseó desarrollar una formulación de al menos un aminoglucósido existente que puede administrarse por vía oral. El aminoglucósido amikacina se seleccionó para preparar cocleatos de amikacina.
- 35 Los vehículos de administración de cocleatos son precipitados de cationes fosfolipídicos cristalinos estables compuestos de materiales simples que se producen de manera natural, tales como fosfatidilserina y calcio. Tienen una estructura multiestratificada única que consiste en una lámina bicapa lipídica sólida, continua y grande enrollada en una espiral o como láminas apiladas, sin espacio acuoso interno. Esta estructura única proporciona protección frente a la degradación para moléculas "encocleadas" asociadas. Puesto que la estructura del cocleato completa es una serie de capas sólidas, los componentes dentro del interior de la estructura del cocleato permanecen intactos, incluso aunque las capas exteriores del cocleato puedan exponerse a condiciones ambientales rigurosas o enzimas. Las concentraciones de cationes divalentes *in vivo* en suero y secreciones mucosas son tales que la estructura del cocleato se mantiene. Por tanto, la mayoría de moléculas asociadas al cocleato están presentes en las capas interiores de una estructura sólida, estable e impermeable. Una vez dentro del interior de una célula, sin embargo, la baja concentración de calcio da como resultado la apertura del cristal de cocleato y la liberación de la molécula que se había formulado en los cocleatos.
- 40 Para determinar si una formulación oral mejorada de amikacina resultará eficaz contra *Mycobacterium avium*, se utilizaron vehículos de administración de cocleatos para preparar cocleatos de amikacina. Basándose en estudios previos, las moléculas formuladas en los cocleatos son eficaces en administración intracelular.
- 45 La infección por *Mycobacterium avium* es común en pacientes inmunodeprimidos e individuos con estados pulmonares crónicos. El tratamiento eficaz de la infección por *Mycobacterium avium* se limita a unos pocos compuestos, y el uso del aminoglucósido amikacina está restringido por la vía de administración (intravenosa o intramuscular) y la toxicidad. El uso generalizado de aminoglucósidos se ha limitado debido a su toxicidad (nefrototoxicidad y ototoxicidad) y la vía de administración inapropiada (intravenosa o intramuscular). La administración intracelular ineficiente del aminoglucósido amikacina es responsable, en parte, de los diversos efectos adversos relacionados con altos niveles de fármaco en plasma. Además, el uso de amikacina para la terapia de primera línea está limitado debido a una mala absorción oral, una semivida corta y toxicidades renales y auditivas graves, el cual necesita administración intravenosa frecuente, con monitorización concomitante de los niveles de fármaco para asegurar que los niveles en plasma permanecen dentro de una ventana terapéutica estrecha.
- 50 Las células que eliminan partículas, fagocitos, que incluyen macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, representan una primera línea principal de defensa contra la infección microbiana. Muchos patógenos incluyendo *M. avium* han desarrollado estrategias que permiten a estos microorganismos subvertir o incluso utilizar la fisiología de
- 55
- 60
- 65

los fagocitos para multiplicar y producir enfermedades. Un reto principal para el tratamiento eficaz de microorganismos intracelulares es la dificultad de lograr una administración muy eficaz de los agentes antimicrobianos a través de la membrana plasmática de células infectadas.

5 a. Preparación de formulaciones de cocleato, incluyendo razones de lípido con respecto a fármaco variables y concentración de sal variable

10 Las formulaciones de cocleato de amikacina (Amkch) se optimizaron para la eficiencia de la encocleación de amikacina y el tamaño de partícula variando el tipo de PS usado, la razón PS:fármaco, la razón PS:Ca y la concentración de NaCl (figura 1)

15 Para hacer una suspensión concentrada de cocleatos cristalinos de amikacina con una razón lípido:fármaco de aproximadamente 10:1, a NaCl 0 M, se mezcló amikacina de 200 mg en 20 ml de agua D.D. (doblemente destilada), se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se combinó con 2000 mg de liposomas de PS de soja al 50% en 200 ml de agua esterilizada (primero se filtraron los liposomas de PS a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. Luego se añadieron a la mezcla resultante 17 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezclado vigoroso (agitación) durante la adición para formar cocleatos. Luego se secaron los cocleatos de amikacina bajo liofilización. Se añadió agua esterilizada a los cocleatos de amikacina en polvo seco para preparar una suspensión de aproximadamente 6,7 mg de amikacina/ml (1,0 mg/150 µl) con una razón lípido:amikacina de aproximadamente 10:1.

25 Para hacer una suspensión concentrada de cocleatos cristalinos de amikacina con una razón lípido:fármaco de aproximadamente 10:1, y un tamaño de partícula reducido, en NaCl 0,66 M, se filtró amikacina de 200 mg en 20 ml de agua D.D. (doblemente destilada) a través de un filtro de 0,22 µm y se combinó con 2000 mg de liposomas de PS de soja al 50% en 200 ml de agua esterilizada (primero se filtraron los liposomas de PS a través de filtros de 5, 0,8 y 0,45 µm) para formar liposomas que contenían la amikacina. Se añadieron a la mezcla resultante 17 ml de cloruro de calcio 0,1 M con mezclado vigoroso (agitación) durante la adición para formar cocleatos. Para reducir el tamaño de agregación de los cristales de cocleato, se añadieron luego 1125,2 mg de cloruro de sodio en 3,88 ml de agua esterilizada a la mezcla de los cocleatos. Luego se secaron los cocleatos de amikacina bajo liofilización. Se añadió agua esterilizada a los cocleatos de amikacina en polvo seco para preparar una suspensión de aproximadamente 6,7 mg de amikacina/ml (1,0 mg/150 µl) con una razón lípido:amikacina de aproximadamente 10:1, y una alta (0,66 M) concentración de NaCl.

35 La tabla 1 recoge la cantidad de amikacina en los sobrenadantes obtenidos de las suspensiones de cocleatos de amikacina antes y después de la liofilización y la reconstitución con agua esterilizada. Se midió la amikacina usando el ensayo colorimétrico de ninhidrina.

Tabla 1: Porcentaje de amikacina restante con cocleatos granulados

	Razón del PS de soja con respecto al fármaco	Cocleatos de amikacina con 0 de NaCl (antes de la liofilización)	Cocleatos de amikacina con 0 de NaCl (después de la liofilización)	Cocleatos de amikacina con alto NaCl (antes de la liofilización)	Cocleatos de amikacina con alto NaCl (después de la liofilización)
Supt. de cocleato	10:1	33,3%	36,2%	38,8%	40,5%
AMK encocleada	10:1	66,7%	63,8%	61,2%	59,5%

40 Las formulaciones que se sometieron a prueba en los estudios descritos a continuación no se lavan, ni para los estudios *in vitro* ni para los *in vivo*. La cantidad de amikacina dosificada se calcula a partir de la cantidad inicial de amikacina en la formulación de partida. La administración de dosis no es dependiente de la eficiencia de la encocleación de amikacina. Se prepararon cocleatos de gentamicina (Gecch) de la misma manera.

45 b. Evaluaciones biológicas de preparaciones de cocleato: ensayos de macrófagos *in vitro*

50 Se evaluó la eficacia de Amkch contra infecciones por *Ma* intracelulares *in vitro* usando macrófago peritoneal de ratón infectado con cepas de *M. avium* MAC 101 o MAC 109. Se sembraron células de macrófagos Raw 264.7 peritoneales de ratón (Mo) a 10⁵ células/pocillo. Se infectaron monocapas de Mo a una razón de 1:10 durante 1 hora y se eliminaron las bacterias extracelulares. Se trataron las monocapas con amikacina libre y/o preparaciones de cocleato durante 4 días y se determinó el número de bacterias intracelulares. Los ensayos se repitieron tres veces.

5 Las preparaciones de cocleato usadas para evaluar la actividad biológica contra *Mycobacterium avium in vitro* incluían: 1. 2,0 ml /vial de formulación de amikacina con NaCl 0 M con 0,5 mg/ml; 2. 2,0 ml /vial de formulación de amikacina con NaCl 0,066 M con 0,5 mg/ml; 3. 2,0 ml /vial de formulación de amikacina con NaCl 0,33 M con 0,5 mg/ml; 4. 2,0 ml /vial de formulación de amikacina con NaCl 0,66 M con 0,5 mg/ml; 5. 2,0 ml /vial de formulación de placebo con NaCl 0 M con 5 mg de PS/ml; 6. 2,0 ml /vial de formulación de placebo más amikacina con 0,5 mg/ml; y 7. 2,0 ml /vial de amikacina libre en agua con 0,5 mg/ml.

10 Las tablas 2-3 muestran recuentos bacterianos de cada experimento. Los datos se representan de manera gráfica en las figuras 2A-2B. Las cepas de Ma de control no tratadas crecieron dentro de Mo desde $3,8 \pm 10^5$ hasta $4,9 \pm 10^6$. Se destruyeron Ma dentro de Mo tratado con amikacina libre (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) hasta $4,9 \pm 10^4$ y $3,8 \pm 10^4$ bacterias, respectivamente. Los Amkch optimizados (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) demostraron eficacia mejorada más de 10 veces, reduciendo el recuento bacteriano a $3,9$ y $1,7 \pm 10^3$ bacterias dentro de Mo ($p < 0,05$ comparado con amikacina libre). Se obtuvieron resultados similares para experimentos realizados usando preparaciones de cocleato de gentamicina (tabla 4). Específicamente, a las concentraciones de NaCl más altas, los resultados con los cocleatos de gentamicina son al menos 1 log mejores que la gentamicina libre.

Tabla 2: Recuentos bacterianos después de que macrófagos infectados con *M. avium* 101 se trataran con Amkch

Tratamiento	N.º de bacterias en el día 4	Valor de p
Inóculo intracelular	$3,8 \pm 0,4 \times 10^5$	
Control no tratado (4 días)	$4,9 \pm 0,5 \times 10^6$	
amikacina con NaCl 0 M, 20 $\mu\text{g/l}$	$3,3 \pm 0,6 \times 10^5$	(2)
amikacina con NaCl 0 M, 10 $\mu\text{g/l}$	$5,8 \pm 0,4 \times 10^5$	(2)
amikacina con NaCl 0,066 M, 20 $\mu\text{g/l}$	$5,3 \pm 0,3 \times 10^4$	(1)
amikacina con NaCl 0,066 M, 10 $\mu\text{g/l}$	$7,1 \pm 0,4 \times 10^4$	(2)
amikacina con NaCl 0,33 M, 20 $\mu\text{g/l}$	$4,1 \pm 0,4 \times 10^3$	(1) (3)
amikacina con NaCl 0,33 M 10 $\mu\text{g/l}$	$8,8 \pm 0,3 \times 10^3$	(1)
amikacina con NaCl 0,66 M, 20 $\mu\text{g/l}$	$1,7 \pm 0,6 \times 10^3$	(1)
amikacina con NaCl 0,66 M, 10 $\mu\text{g/l}$	$3,9 \pm 0,4 \times 10^3$	(1)
Placebo + amikacina 20 $\mu\text{g/l}$	$3,4 \pm 0,4 \times 10^4$	(1)
Placebo + amikacina 10 $\mu\text{g/l}$	$6,1 \pm 0,4 \times 10^4$	(1)
Placebo	$1,9 \pm 0,5 \times 10^6$	
Placebo	$2,3 \pm 0,4 \times 10^6$	
Amikacina libre 20 $\mu\text{g/l}$	$3,8 \pm 0,5 \times 10^4$	(1)
Amikacina libre 10 $\mu\text{g/l}$	$4,9 \pm 0,3 \times 10^4$	(1)

20 (1) $p < 0,05$ en comparación con el inóculo intracelular

(2) $p < 0,05$ en comparación con el control no tratado (4 días)

(3) $p < 0,05$ en comparación con el placebo de amikacina/cocleato o amikacina libre

25 Tabla 3: Recuentos bacterianos después de que macrófagos infectados con *M. avium* 109 se trataran con Amkch

Tratamiento	N.º de bacterias en el día 4	Valor de p
Inóculo intracelular	$2,4 \pm 0,3 \times 10^5$	
Control no tratado (4 días)	$3,1 \pm 0,6 \times 10^6$	
amikacina con NaCl 0 M, 20 $\mu\text{g/l}$	$2,0 \pm 0,6 \times 10^5$	(2)
amikacina con NaCl 0 M, 10 $\mu\text{g/l}$	$4,1 \pm 0,4 \times 10^5$	(2)

amikacina con NaCl 0,066 M, 20 µg/l	$1,6 \pm 0,5 \times 10^4$	(1)
amikacina con NaCl 0,066 M, 10 µg/l	$3,2 \pm 0,3 \times 10^4$	(1)
amikacina con NaCl 0,33 M, 20 µg/l	$5,3 \pm 0,3 \times 10^3$	(1) (3)
amikacina con NaCl 0,33 M 10 µg/l	$9,3 \pm 0,5 \times 10^3$	(1)
amikacina con NaCl 0,66 M, 20 µg/l	$2,6 \pm 0,4 \times 10^3$	(1) (3)
amikacina con NaCl 0,66 M, 10 µg/l	$9,6 \pm 0,5 \times 10^3$	(1)
Placebo + amikacina 20 µg/l	$2,5 \pm 0,5 \times 10^4$	(1)
Placebo + amikacina 10 µg/l	$4,4 \pm 0,3 \times 10^4$	(1)
Placebo	$2,5 \pm 0,5 \times 10^6$	
Placebo	$4,4 \pm 0,3 \times 10^6$	
Amikacina libre 20 µg/l	$2,9 \pm 0,4 \times 10^4$	(1)
Amikacina libre 10 µg/l	$5,0 \pm 0,3 \times 10^4$	(1)

(1) p<0,05 en comparación con el inóculo intracelular

(2) p<0,05 en comparación con el control no tratado (4 días)

5 (3) p<0,05 en comparación con el placebo de amikacina/cocleato o amikacina libre

Tabla 4: Recuentos bacterianos después de que macrófagos infectados con *M. avium* 101 se trataran con Gecch

	Día 0	N.º de bacterias en el día 4	Valor de p
inóculo intracelular (tiempo 0)	$3,9 \pm 0,5 \times 10^5$	--	--
control no tratado (4 días)		$6,4 \pm 0,5 \times 10^6$	--
gentamicina con NaCl 0 M, 30 µg/ml		$6,1 \pm 0,4 \times 10^5$	(2)
gentamicina con NaCl 0,066 M, 30 µg/ml		$8,9 \pm 0,3 \times 10^4$	(1) (2)
gentamicina con NaCl 0,33 M, 30 µg/ml		$5,1 \pm 0,6 \times 10^4$	(1) (2) (3)
gentamicina con NaCl 0,66 M, 30 µg/ml		$2,2 \pm 0,3 \times 10^4$	(1) (2) (3)
Fosfato/gentamicina baja en calcio 30 µg/ml		$1,2 \pm 0,3 \times 10^5$	(1) (2)
Fosfato/gentamicina alta en calcio 30 µg/ml		$1,6 \pm 0,4 \times 10^5$	(1) (2)
Placebo + gentamicina 30 µg/ml		$2,7 \pm 0,5 \times 10^5$	(2)
Placebo		$5,9 \pm 0,3 \times 10^6$	
Gentamicina libre 30 µg/ml		$1,9 \pm 0,3 \times 10^5$	(2)

(1) p<0,05 en comparación con el inóculo intracelular

10

(2) p<0,05 en comparación con el control no tratado (día 4)

(3) p<0,05 en comparación con el control de gentamicina/cocleato o gentamicina libre

15 c. Evaluaciones biológicas de preparaciones de cocleato: experimentos en ratón C57/BL/6 in vivo

Se evaluó la eficacia *in vivo* de cocleatos de amikacina contra el complejo *Mycobacterium avium* usando ratones negros C57BL/6. Se infectaron los ratones, 12/grupo, con *M. avium* 101 ($8,1 \pm 10^7$ bacterias/ratón) por inyección en la vena de la cola. Tras 7 días, se recogieron 6 ratones y se cuantificó el número de MAC en el bazo para establecer la carga bacteriana de referencia (tiempo 0). Se trataron los ratones con diversas preparaciones de amikacina (indicadas a continuación) a 1 mg de amikacina/ratón/día durante 2 semanas. Se recogieron ratones en la semana 3 y 2 días después (tras 2 semanas de tratamiento), y se homogeneizaron los bazos y se sembraron en placa sobre agar 7H10. Se contaron las colonias sobre las placas y se analizaron los datos.

20

25 Los grupos de ratones incluían los siguientes: grupo 1-control infectado de 1 semana; grupo 2-control infectado no

tratado de 3 semanas; grupo 3-alto en sal de cocleato-AMK, oral, 1 mg/ratón/día; grupo 4-alto en sal de cocleato-AMK, I.P., 1 mg/ratón/día; grupo 5-sin sal de cocleato-AMK, oral, 1 mg/ratón/día; grupo 6-sin sal de cocleato-AMK, I.P., 1 mg/ratón/día; grupo 7-amikacina libre, oral, 1 mg/ratón/día; grupo 8-amikacina libre. I.P., 1 mg/ratón/día; grupo 9-cocleatos de placebo, oral; y grupo 10-cocleatos de placebo, I.P.

5 El recuento bacteriano en bazo de ratones C57BL6 después de 2 semanas de tratamiento se muestra en la tabla 5. La representación gráfica los resultados de eficacia *in vivo* se muestran en la figura 3. Por tanto, las preparaciones de cocleato, ya sea dada por vía oral o I.P., eran activas y redujeron el número de carga bacteriana en el bazo. Además, la preparación de cocleato de amikacina con alta concentración de sal dosificada por vía oral era significativamente más activa que la amikacina libre. Además, las dosis de amikacina usada en el estudio fue posteriormente la dosis tolerada. Pueden usarse dosis mayores con efecto potencialmente mejorado. Finalmente, los resultados muestran el potencial de las preparaciones de cocleato para administrar amikacina por vía oral en concentraciones de anti-*M. avium* eficaces.

15 Tabla 5: Recuentos bacterianos esplénicos (UFC) en ratones C57BL/6 infectados con *M. avium* 101 después de 2 semanas de tratamiento

Grupo experimental	Vía de administración del tratamiento	UFC/bazo	Valor de p
1 semana (control)	---	$2,1 \pm 0,4 \times 10^6$	---
3 semanas (control infectado)	---	$7,8 \pm 0,4 \times 10^7$	---
Cocleatos de AmK	oral	$5,5 \pm 0,3 \times 10^7$	NS
Cocleatos de AmK	I.P.	$8,1 \pm 0,4 \times 10^6$	(1) (2)
Cocleatos de AmK con NaCl alto	oral	$3,4 \pm 0,2 \times 10^7$	(1) (3)
Cocleatos de AmK con NaCl alto	I.P.	$1,1 \pm 0,5 \times 10^7$	(1)
Cocleato de placebo	oral	$7,5 \pm 0,5 \times 10^7$	NS
Cocleato de placebo	I.P.	$7,8 \pm 0,3 \times 10^7$	NS
AmK libre	oral	$6,9 \pm 0,3 \times 10^7$	NS
AmK libre	I.P.	$9,3 \pm 0,4 \times 10^6$	(1)

(1) $p < 0,05$ en comparación con el control a las 2 semanas

20 (2) $p < 0,05$ en comparación con la administración oral/I.P. de la preparación de cocleato

(3) $p < 0,05$ en comparación con la amikacina libre administrada por la misma vía. Por tanto, los datos demuestran que los cocleatos de amikacina son una formulación prometedora de un aminoglucósido para administración oral a concentraciones de anti-*M. avium* eficaces.

25 Ejemplo 2: Formulaciones de anfotericina B para administración y suministro oral (parte de la divulgación)

Aunque la anfotericina B (AmB; figura 4) es todavía uno de los antifúngicos más eficaces después de 60 años de uso, las formulaciones comerciales se restringen a la administración intravenosa y la molécula es altamente tóxica. El principal producto en desarrollo usando tecnología de cocleatos es cocleato de anfotericina B (CAMB; también conocido como anfotericina B Bioral™) y es un modelo para la encocleación de fármacos hidrófobos o anfífilos. La figura 5 muestra una representación esquemática de una estrategia de fabricación para hacer CAMB. Los siguientes resultados demuestran que la administración oral de CAMB es tan eficaz como las dosis inyectables equivalentes de la formulación líder de AmB (Fungizone) en modelos de ratón de aspergilosis y candidiasis sistémica. Fungizone es de aproximadamente 5-10 nm en diámetro, mientras que CAMB es de aproximadamente 200-300 nm en diámetro. La CAMB también demuestra una toxicidad sustancialmente inferior que los productos de AmB comerciales existentes. Además, la CAMB demuestra buena seguridad en ratas y perros en estudios de toxicidad de 7 y 28 días.

a. Inhibición de crecimiento de *Candida* dentro de macrófagos *in vitro*

5 Los resultados mostrados en la figura 6 demuestran que CAMB es más eficaz que Fungizone (DAMB) en la inhibición de la infección por *Candida albicans* en macrófago *in vitro*. Específicamente, todas las concentraciones de CAMB (cocleatos de anfotericina B) son tan eficaces como DAMB (Fungizone) en la inhibición del crecimiento de cultivos de *Candida* en ausencia de macrófagos. Sin embargo, en presencia de macrófagos infectados por *Candida*, CAMB es significativamente más eficaz que DAMB, que muestra caídas de UFC cercanas a cero hasta 0,01 µg/ml mientras que DAMB muestra UFC cercanas a 300 a esta concentración. Los resultados demuestran que CAMB administra AmB de manera más eficaz en macrófagos que Fungizone.

b. Inhibición de infección por *Aspergilosis fumigatis in vivo*

15 La figura 7 muestra un protocolo esquemático para evaluar el análisis de supervivencia y de carga tisular de infección por aspergilosis sistémica de ratones y el tratamiento posterior con cocleatos de anfotericina B (CAMB) y Fungizone (DAMB) orales. De manera breve, se realizó la evaluación inicial de formulaciones de CAMB en un modelo murino para aspergilosis diseminada. Los ratones se volvieron susceptibles a la infección por *A. fumigatus* a través de inmunodepresión transitoria con ciclofosfamida. Los ratones (20-25 g) se trataron con ciclofosfamida (200 mg/kg I.V. a través de la vena lateral de la cola) 3 días antes de la infección de la vena de la cola con 10⁵⁻⁶ esporas de *A. fumigatus*. Se comenzó el tratamiento inmediatamente después de la infección mediante administración oral de CAMB a 0-40 mg/kg/día y duró durante 10 días. Fungizone sirvió como control positivo y se administró I.P. a 4 mg/kg/día. Esto produjo normalmente una supervivencia del 50-80%. Los ratones mostraron una mortalidad del 100% dentro de 8-10 días. Se recogieron los riñones, el hígado y los pulmones de cada animal y se evaluará la carga fúngica mediante dilución en serie y sembrado en placa de homogenatos de tejidos. Se evaluaron estadísticamente los datos de mortalidad mediante análisis de Kaplan-Meier seguido por la prueba de Wilcoxon. Un valor de p de P<0,05 se consideró una diferencia estadísticamente significativa. Se realizaron comparaciones de recuentos de colonias entre diferentes grupos de tratamiento mediante la prueba Kruskal-Wallis con comparación múltiple. Un valor de P de <0,05 se consideró estadísticamente significativo. Todo el análisis estadístico se realizó con el paquete de software GBSTAT (Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, MD.).

30 Se demostró que CAMB aumenta la supervivencia de ratones de una manera dependiente de la dosis (figura 8). DAMB a 4 mg/kg mostró solo una protección moderada del 20% de la cohorte, mientras que dosis superiores de DAMB eran tóxicas para los animales. En cambio, el 60% de ratones sobrevivió cuando se les trató con 20 mg/kg de CAMB y el 70% de ratones sobrevivió cuando se les trató con 40 mg/kg de CAMB.

35 Los efectos de CAMB sobre la supervivencia de los ratones está acompañada por una reducción en la carga fúngica tisular de órganos diana. Específicamente, se observó una reducción logarítmica de 2 a 3 en UFC por gramo de tejido para CAMB (oral; v.o.) a dosis de 10 mg/kg/día (figura 9). La infección por *Aspergillus* casi se erradicó en dosis por encima de 20 mg/kg/día, que es aproximadamente comparable a la administración intraperitoneal de DAMB a 2,0 mg/kg/día. El análisis de carga tisular del riñón mostró que CAMB era más potente que Fungizone® (DAMB) a 1 mg/kg/día y equivalente a AmBisome® (LAMB) a 10 mg/kg/día.

c. Datos farmacocinéticos de CAMB *in vivo* a partir de modelos animales

45 Se abrió un nuevo estudio de investigación de fármacos (IND) para cocleatos de AmB y se han iniciado de manera satisfactoria los ensayos clínicos en humanos de fase I basándose en la seguridad observada en animales, la eficacia en animales, la estabilidad de la vida útil de almacenamiento, los procedimientos de fabricación BPF reproducibles y la rentabilidad.

50 Se realizó un estudio de toxicidad de 28 días para determinar los efectos tóxicos potenciales, órganos diana de la toxicidad, y un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en ratas y perros tras la dosificación oral diaria con CAMB. Se prepararon lotes BPL a gran escala de CAMB y placebo (vehículo de cocleato sin AmB) para estos estudios de 28 días con una concentración de AmB de 5 mg/ml. Se administró CAMB diariamente como dosis única mediante sonda oral a 10 perros por grupo (5 m, 5 h) a dosis de 15, 30 y 45 mg/kg y a 48 ratas (24 m, 24 h) a dosis de 30, 45 y 90 mg/kg. Se evaluaron los parámetros cardiovasculares en perros antes del estudio y en la semana 4. En ratas, 18 animales (9 m, 9 h) por grupo de dosis sirvieron como un grupo satélite para muestras TK (muestras de sangre, orina y heces para el análisis del fármaco). Se sacrificaron los animales en el día 29 o en el día 42, 2 semanas tras la última administración de dosis. Se recogieron muestras de TK de sangre (días 1 y 28 (perro) y 23 (rata)), orina y heces (semanas 1 y 4), y tejido (en necropsia) para la cuantificación de AmB mediante métodos de CL-EM validados. Se realizaron análisis clínicos, pruebas de bioquímica sérica, análisis de orina y análisis de histopatología en todos los animales.

65 Se determinó que CAMB era bien tolerado por ratas y perros a todas las dosis sin encontrarse mortalidades o anomalías clínicas en ninguna de las especies basándose en la comparación con controles históricos. Los datos farmacocinéticos en perros para el día 1 eran comparables con los estudios de 7 días previos. El aumento en la concentración de AmB en plasma máxima (C_{máx}) en perros no era dependiente de la dosis después de 28 días,

similar a lo que se había observado en el día 7 en el estudio de 7 días. En perros, el riñón tenía concentraciones cuantificables de AmB a todas las dosis mientras que el hígado, pulmón y bazo tenían concentraciones de AmB detectables a las 3 dosis. En ratas, se encontraron concentraciones de AmB cuantificables en hígado, pulmón y riñón, pero no en bazo. Se realizarán análisis histopatológicos y analíticos adicionales en perros y ratas.

5 En cuanto a mortalidad/morbilidad y observaciones clínicas, todos los animales sobrevivieron hasta su necropsia programada, excepto dos perros hembra en el grupo de dosis alta. La evaluación microscópica confirmó que las muertes de los dos perros no se relacionaban con el artículo de prueba sino a errores en administración por sonda. No se encontraron cambios clínicos de significancia toxicológica en el control o en los grupos tratados con CMB. No se observaron diferencias importantes en el peso corporal y el aumento de peso corporal entre el control y los grupos tratados con CMB. No hubo cambios estadísticamente significativos en el consumo de alimentos en el control frente a los grupos tratados. Los cambios en la temperatura corporal (hembras en los grupos tratados, día 28) estuvieron dentro del intervalo normal. En cuanto a *bioquímica sérica y coagulación*, todos los cambios en la administración previa al estudio y posterior a la dosis fueron esporádicos, ligeros y dentro de sus respectivos intervalos de referencia normales y no se consideró que estuvieran relacionados con el tratamiento. De manera importante, en ratas y perros, la creatinina y el nitrógeno ureico en sangre estuvieron dentro de los intervalos normales. No se observaron diferencias entre el control y los grupos tratados con CMB basándose en los análisis de orina. No hubo anomalías electrocardiográficas ni cambios en la tensión arterial relacionados con la administración oral de CMB. Cualquier hallazgo microscópico para perros que sobrevivieron hasta la terminación del estudio se consideró no relacionado con la administración del vehículo (controles) o CMB. Los hallazgos se consideraron relacionados con enfermedad o estados espontáneos, o a procedimientos relacionados con las actividades de la necropsia. En perros, los niveles en plasma de AmB estuvieron por debajo del límite inferior cuantificación (LLOQ) de 20 ng/ml en varios puntos de tiempo tras la administración de dosis bajas (15 mg/kg), especialmente en el día 1. En conjunto, los niveles de fármaco en plasma en el día 28 fueron superiores que aquellos en el día 1 en todas las 3 dosis de CMB. Todas las concentraciones en orina estuvieron por encima del LLOQ de 20 ng/ml. La excreción urinaria a lo largo de 24 h en los días 1 y 28 no mostraron una clara tendencia de acumulación del fármaco en orina en contraste al plasma. La excreción de AmB en orina fue despreciable, oscilando desde el 0,02 hasta el 0,05% de la dosis administrada.

30 En cuanto a los análisis toxicocinéticos (TK), los valores de $t_{m\acute{a}x}$ promedio de todos los grupos de dosis oscilaron desde 7,2 hasta 17,6 h en el día 1 y desde 3,6 hasta 8,4 h en el día 28. Parecía haber una acumulación de AmB con la administración de dosis repetidas, tal como indican los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y $AUC_{\acute{u}ltima}$ aumentados en el día 28 cuando se comparan con los valores correspondientes en el día 1. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ promedio en el día 28 fueron ~ de 1,1 a 2,3 veces superiores a los obtenidos para el día 1. De la misma manera, las estimaciones de $AUC_{\acute{u}ltima}$ promedio en el día 28 fueron ~ de 1,9 a 7,5 veces superiores en el día 28 que las estimaciones para el día 1. No se pudo estimar el $t_{1/2}$ de plasma para varios animales, especialmente a la dosis más baja y en el día 1, debido al número limitado de concentraciones en plasma tras $t_{m\acute{a}x}$ que fueron > LLOQ del ensayo bioanalítico, o debido a la falta de un buen ajuste ($r < 0,8$) de la línea de mejor ajuste en la fase de eliminación terminal. Al parecer no hubo diferencias importantes en las toxicocinéticas en plasma de AmB entre machos y hembras en ambos días de muestreo de sangre.

Basándose en los resultados, este estudio demostró que dosis orales diarias únicas de CMB administradas durante 28 días son bien toleradas en todos los grupos de dosis en la rata y el perro. El NOAEL para machos y hembras se consideró que era al menos de 45 mg/kg para perro y 90 mg/kg para rata. Se midieron concentraciones cuantificables de AmB en riñón del perro y de la rata así como en el hígado y el pulmón de la rata. La administración oral diaria de CMB a perros Beagle machos y hembras a 15, 30 ó 45 mg/kg/día y ratas machos y hembras a 30, 45 ó 90 mg/kg/día no produjo efectos adversos evidentes. El NOAEL es al menos de 45 mg/kg/día en perros y de 90 mg/kg/día en ratas para administración de dosis oral diaria de CMB durante 28 días consecutivos. No se observaron efectos relacionados con el artículo de la prueba en los siguientes parámetros: observaciones clínicas, pesos corporales, consumo de alimentos, temperatura corporal, análisis clínicos (hematología, bioquímica sérica y coagulación), análisis de orina, oftalmología, cardiología, pesos de órganos, evaluaciones macroscópicas y microscópicas. Los análisis toxicocinéticos indicaron una acumulación de AmB en los 3 grupos de dosis en el día 28 después de la administración repetida tal como se indica mediante las $C_{m\acute{a}x}$ y $AUC_{\acute{u}ltima}$ aumentadas. La excreción urinaria del fármaco fue despreciable cuando se comparó con la dosis real administrada. No hubo diferencias importantes entre perros machos y hembras en la disposición del fármaco a los niveles de dosis estudiados. Finalmente, el análisis de AmB en tejidos mostró concentraciones cuantificables en riñón de perro pero solo niveles detectables en hígado, pulmón y bazo. En la rata, el hígado, pulmón y riñón mostraron concentraciones cuantificables de AmB pero no en el bazo.

60 d. Datos farmacocinéticos de CMB *in vivo* de sujetos humanos

Se reclutaron dieciséis sujetos humanos para cada cohorte (12 CMB, 4 vehículos de coceleato vacíos de placebo). Se administró CMB o placebo de Bioral de volumen coincidente (vehículo de administración sin anfotericina B) por vía oral en modo doble ciego después del ayuno nocturno. Se le dio a cada sujeto una dosis única. Se realizaron evaluaciones de seguridad y farmacocinéticas durante 2 semanas después de la administración. Se reclutaron sujetos en 3 cohortes dando dosis ascendentes de 200, 400 y 800 mg. Esto fue un estudio farmacocinético (PK) de

dosis única, doble ciego, de dosis ascendente en voluntarios sanos, diseñado para determinar la seguridad, la tolerabilidad y el perfil PK de anfotericina B y para estimar la biodisponibilidad relativa con un estudio cruzado en comparación con otras formulaciones de anfotericina. Se planeó un total de 48 sujetos para la participación en este estudio, a través de 3 cohortes, 16 por cohorte de tratamiento. Dentro de cada cohorte de tratamiento, 12 sujetos recibieron fármaco activo y 4 recibieron placebo. Los sujetos ingresaron a la clínica en el día 0 y se aleatorizaron para el tratamiento activo (200, 400 ó 800 mg de CAMB dependiendo de la cohorte) o placebo. Las muestras de sangre para el análisis PK se recogieron antes de la dosis (0 horas), y después de la dosis en el día 0 (1, 2, 4, 8 y 12 horas) y en el día 1 (24 horas). Se dio de alta a los sujetos de la clínica cuando se completaron los procedimientos programados. Se recogieron muestras de sangre adicionales en un plan ambulatorio en los días 2, 3, 4, 8, 9 y 14 (48, 72, 96, 192, 216 y 336 horas). Se evaluó la seguridad monitorizando acontecimientos adversos (AA), medicación concomitante, exploración física e historial clínico, y mediciones de laboratorio clínico y de las constantes vitales.

Por ejemplo, la figura 10 muestra los resultados de datos farmacocinéticos de CAMB de la administración a perros y humanos. Los resultados demuestran que los niveles en plasma de CAMB en ratas y perros se asocian con niveles en tejidos de CAMB terapéuticos. Específicamente, CAMB fue bien tolerado a dosis orales únicas de 200 y 400 mg. Las concentraciones en plasma de anfotericina se obtuvieron a partir de esta forma de dosificación oral y son comparables a los resultados previos de los estudios de toxicología en animales. La figura 10, así como la tabla 6, demuestran además que los niveles en plasma de CAMB en perros y humanos son extremadamente similares. Se notificaron acontecimientos adversos para la cohorte completa de 16 sujetos. Se observaron acontecimientos adversos gastrointestinales en el 6%, el 38% y el 56% de los sujetos a 200, 400 y 800 mg, respectivamente, y todos fueron leves a dosis de 200 y 400 mg. El AA más común fueron las náuseas, observadas en el 6% de sujetos que tomaban 200 mg y en el 19% de sujetos que tomaban 400 mg, y fueron de gravedad leve en todos los casos a aquellos niveles de dosis. Una sujeto se quedó embarazada y se sometió a terminación electiva. No hubo anomalías en las pruebas de laboratorio clínico de sangre u orina. Se realizó la evaluación farmacocinética de anfotericina. Por tanto, no hubo acontecimientos adversos graves ni retiradas debido a acontecimientos adversos. No se observaron anomalías en el laboratorio u otras pruebas de seguridad, incluyendo las asociadas con la función renal.

Tabla 6: Análisis farmacocinético de dosis única de CAMB

Comparación de perros y humanos

Especie	Dosis	HED (dosis equivalente humana)	C _{máx} ng/ml	T _{máx} Horas	AUC ₀₋₂₄ ng-h/ml
Humano	~3 mg/kg - 4 mg/kg	-	Media 70,3	8-12	1231
Perro*	15 mg/kg	8,1 mg/kg	48,5	12	833
Perro*	30 mg/kg	16,2 mg/kg	67,2	12	1400
Perro*	45 mg/kg	24,3 mg/kg	80,2	6	1653

Se ha desarrollado un procedimiento de fabricación comercialmente viable y rentable para cocleatos de AmB y se han producido lotes BPF de 100 litros de cocleatos de AmB ampliados a escala.

Ejemplo 3: Formulaciones de cocleato de amikacina contempladas para administración y suministro oral

Un procedimiento ampliado a escala de buenas prácticas de laboratorio (BPL) puede desarrollarse para formulaciones de cocleato de amikacina similar a las de cocleatos de AmB preparando 1 l, 5 l y 20 l, o más lotes. Las propiedades físicas y químicas de los Amkcch se medirán para todos los lotes preparados. Estas mediciones incluirán la eficiencia de la encocleación de amikacina, la razón lípido:fármaco y el tamaño de partícula. Se determinará la reproducibilidad lote a lote del producto.

a. Determinación de la concentración de amikacina mediante HPLC

Se han desarrollado e informado muchos procedimientos para la cuantificación de aminoglucósidos, incluyendo amikacina, en fluidos y tejidos, (PaPP, E, Knupp, C., y Barbhaiya, R.H., J. Chromatography, 574: 93-99, 1992; Soltes, I. Biomedical Chromatography 13: 3-10, 1999). Puede diseñarse un ensayo de HPLC de amikacina cuantitativo.

b. Determinación de la actividad de amikacina mediante un ensayo basado en placas de microtitulación

La actividad de amikacina también puede determinarse usando ensayos basados en placas de microtitulación usando, por ejemplo, *E. Coli*. Por ejemplo, la influencia de diferente concentración de amikacina sobre el crecimiento de la cepa ATCC 25922 de referencia de *E. coli* (colección americana de cultivos tipo) se determinó mediante el

método de placas de microtitulación tal como se describe en José A. Rufián-Henares, Francisco J. Morales (Food Chemistry, 111: 1069-1074, 2008). Durante la noche se hizo crecer una suspensión de *E. coli* a 37°C en caldo LB en el agitador a una velocidad de 250 rpm durante 24 horas (modo New Brunswick Scientific: INNVOA 40R). Se suministró caldo LB de medio de crecimiento bacteriológico por Life Technologies. Se suministró un grupo de cultivo celular de 96 pocillos de poliestireno transparente con fondo plano y placa estéril con tapa de baja evaporación por el distribuidor Fisher.

Se realizaron experimentos preliminares para definir la concentración inicial de inóculos de la cepa de *E.coli*. Se realizaron diluciones en serie doble con caldo LB a partir del cultivo nocturno. Luego se añadieron 250 µl de suspensión de células bacterianas y 250 ul de caldo LB en una microplaca de 96 pocillos estéril (caldo LB para el blanco). Luego se colocó la microplaca de 96 pocillos en las cámaras de Molecular Devices para la lectura de DO con punto final a 600 nm para obtener las densidades ópticas. Una vez que se obtuvo la concentración apropiada de densidad de *E.coli* a partir de la DO, se diluyó el cultivo de bacterias hasta un factor de dilución apropiado en caldo LB recién preparado. Basándose en las características de crecimiento de rutina de *E.coli*, se diluyeron las cepas bacterianas a lecturas de densidad óptica (DO) tomadas durante los experimentos de crecimiento usando un lector de microplacas SPECRAmax 340 de Molecular Devices a una longitud de onda de 600 nm.

Una dilución en serie doble de amikacina libre en caldo LB para control positivo de la actividad bacteriostática. Se tomaron alícuotas de una suspensión de placebo apropiada y cocleatos de amikacina en un tubo estéril de 15 ml, luego se centrifugaron las muestras a 2800 rpm y 4°C (SORVALL RT 6000B) durante aproximadamente 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se almacenó en tubos estériles a 4°C para un ensayo de actividad de microtitulación posterior. Se volvieron a suspender los sedimentos de placebo y cocleatos de amikacina con disolución de cloruro de calcio 2 mM, luego se centrifugaron las muestras de nuevo en las mismas condiciones que anteriormente. Se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender los sedimentos de placebo y amikacina con disolución de cloruro de calcio 2 mM, luego se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones que anteriormente. Se volvieron a suspender los sedimentos de placebo y cocleatos de amikacina con disolución de cloruro de calcio 2 mM y se llevaron al volumen original.

El ensayo de actividad de placas de microtitulación es muy sensible. Serían necesarias diluciones dobles para todas las muestras anteriores para poder evaluar en el intervalo de curvas patrón. Se realizó una curva de control patrón de amikacina en caldo LB aumentando las concentraciones desde 1 hasta 40 µg/ml. Se realizó también un blanco de control de disolución de cloruro de calcio 2 mM. Posteriormente, se dispensaron con cuidado en la microplaca de 96 pocillos 50 ul de las muestras, disolución de caldo LB, disolución de cloruro de calcio 2 mM y muestras patrón en la microplaca de 96 pocillos, 200ul de suspensión de células bacterianas en la microplaca de 96 pocillos, 250 ul de disolución de caldo LB (blanco), 250 ul de suspensión de células bacterianas (control positivo). Se colocó la microplaca en la cámara del lector de placas sin cubiertas, luego se comenzó la lectura inicial a una longitud de onda de 600 nm con punto final para tener una lectura a tiempo 0. Se cambió a un ensayo de registro cinético de crecimiento microbiano en un lector de microplacas de Molecular Devices con 37°C (SPECTRA max 340). Se agitaron las microplacas de 96 pocillos mediante el lector de microplacas durante 10 segundos antes de la primera lectura y 10 segundos entre cada lectura para lograr una suspensión homogénea. Hubo un total de 37 lecturas en un intervalo de 5 minutos y 19 segundos durante un intervalo mínimo. A los tiempos de 3 horas, 5 horas y 22 horas, también se realizaron lecturas de las muestras a una longitud de onda de 600 nm con punto final. Se calculó la curva patrón mediante el software Softmax Pro 3.1.2. Cada experimento se realizó por triplicado.

c. Determinación de fósforo fosfolípido

Determinación de la concentración de fosfato en muestras de fosfolípidos mediante una versión modificada del ensayo de Bartlett (Bartlett, G.R., y (1959) J. Bio. Chem. 224, 466). Este ensayo es adecuado para determinar la concentración de fosfolípidos en formulaciones de cocleato, si los fosfolípidos son el único fosfato que contienen los compuestos en la formulación. Determinación de la concentración de fosfolípidos total en fármacos que contienen o vacíos de formulaciones de cocleato de fosfolípidos de control. La concentración de fármaco de la formulación se divide por la concentración de fosfolípidos de la formulación para determinar la razón de fármaco con respecto a fosfolípidos de la formulación.

Este método se usa para determinar la concentración de fosfolípidos en formulaciones de cocleato. El método es una versión modificada del ensayo de fosfato de Bartlett (Bartlett, G.R., (1959) J. Bio. Chem. 224, 466) el cual mide la concentración de fosfato inorgánico. Este método puede usarse para medir la concentración de cualquier lípido que contiene fosfato tal como fosfatidilserina, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos comunes tienen un grupo fosfato por fosfolípido. El ensayo no distingue entre fosfolípidos diferentes. El ensayo mide la concentración de fosfato molar total debida a los diversos fosfolípidos. Dado que el método detecta la concentración de fosfato, cualquier otra fuente de fosfato en la formulación, por ejemplo del fármaco, tampones u otros excipientes que contengan fosfato, interferirán con el ensayo. Una determinación de fosfolípidos exacta mediante este método requiere que se eliminen otras fuentes de fosfato en la formulación o tenidas en cuenta para los cálculos. Primero se calienta la muestra en presencia de ácido sulfúrico a 200°C durante 1 h en una campana química para descomponer el lípido. Luego se añade peróxido de hidrógeno para decolorar cualquier material carbonizado. Luego se hacen reaccionar las muestras con una disolución de ácido ascórbico/molibdato de amonio

durante 20 minutos a 45°C. En estas condiciones el fosfato reacciona con el molibdato para formar un compuesto de molibdeno de color azul. Se usa una disolución de fosfato de sodio 1,00 mM para generar una curva patrón para el ensayo. La concentración de fosfato se determina midiendo la D.O. del patrón y de la muestra a 820 nm en un espectrofotómetro. La concentración de fosfato de la muestra se determinará cada formulación de muestra con un N=3. Se calcularán la concentración de fosfato mM promedio y la desviación estándar. Se debe tener cuidado para asegurar que cualquier agua usada en este ensayo esté suficientemente desionizada y que el material de vidrio no esté contaminado con fosfato externo de detergentes u otras fuentes. Además, a diferencia de muchos otros ensayos de fosfatos basados en Bartlett, este método no usa etapa de calentamiento con ácido perclórico. Los vapores de ácido perclórico depositan sales explosivas. El calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico trabaja igual de bien y es mucho más seguro.

d. Determinación del tamaño de partícula del producto de cocleato

Determinación de la distribución ponderada en volumen del diámetro de partícula de formulaciones de cocleato mediante dispersión de luz basada en difracción. Los resultados finales incluirán un gráfico de la distribución, los diámetros de partícula máximos (μm) de cada pico diferencial, el diámetro de partícula del volumen total inferior al 50% (μm), el porcentaje del volumen con diámetro de partícula inferior a 1 μm , y el diámetro de partícula del volumen total inferior al 99% (μm).

Las mediciones de dispersión de luz basadas en difracción pueden determinar las distribuciones de tamaño de partícula en el intervalo de 0,04 μm a 2000 μm . Esta técnica se ajusta particularmente bien para determinar distribuciones de tamaño de partícula superiores a 1 μm . Los tamaños de partícula menores de 1 μm se miden de manera más exacta mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Las distribuciones de tamaño de partícula de cocleatos de fosfatidilserina de anfotericina B y cocleatos de fosfatidilserina se miden mediante dispersión de luz basada en difracción usando un dispositivo Coulter LS230 de tamaño de partícula con un accesorio de muestra "small volume module plus". Se incluyen los datos de dispersión diferencial de la intensidad de polarización (PIDS). Se deja calentar el instrumento durante 2 horas antes de la medición. Se aclara la cámara de muestras con volúmenes 2X de agua destilada y volumen 1X de CaCl_2 2 mM. Luego se llena la cámara de muestra con CaCl_2 2 mM. Se hace funcionar el programa de eliminación de burbujas de la bomba para desgasificar el CaCl_2 2 mM. Se hace funcionar la bomba a una velocidad del 50 (%). Se añade una suspensión de cocleato de fosfatidilserina hasta que el porcentaje de oscurecimiento de la PIDS está entre el 45 y el 55%. Se recogen los datos y se almacenan en tres bloques consecutivos de 180 segundos y se procesan usando el modelo óptico de Fraunhofer. Los resultados se representan gráficamente como una distribución normal logarítmica usando el volumen diferencial (%) frente al log del diámetro de partícula y volumen acumulativo (%) frente al log del diámetro de partícula. Se calcularon las estadísticas de la distribución de diámetro de partícula mediante estadísticas aritméticas. Los valores usados para caracterizar la distribución del diámetro de partícula incluyen la moda, la mediana, la media aritmética y la D.E. aritmética (desviación estándar) de la distribución de volumen. La forma de la distribución se define mediante el valor del C.V. (coeficiente de variación) y el valor de la asimetría aritmética. La distribución también se caracteriza por el porcentaje del volumen con un diámetro <1 μm y los diámetros correspondientes a < del 10, 50 y 99% del volumen.

e. Determinación de la estabilidad del producto de cocleato

El producto de cocleato de amikacina preparado durante el procedimiento de ampliación de escala se almacenará como suspensiones y polvos secos (tras liofilización) a 4°C, 25°C y 40°C. El contenido de amikacina (HPLC) y la actividad (ensayo de placas de microtitulación de *E. coli*) se medirán mensualmente durante 6 meses.

f. Determinación de la eficacia oral del producto de cocleato

Los estudios de eficacia oral del producto de cocleato de amikacina se medirán usando un modelo de ratón de infección por *Mycobacterium avium*. Estos estudios incluirán estudios de intervalo de dosis y de dosis máxima tolerada. Los estudios de eficacia oral del producto de cocleato de amikacina en combinación con un segundo fármaco se medirán usando un modelo de ratón de infección por *Mycobacterium avium*. Estos estudios incluirán estudios de intervalo de dosis y de dosis máxima tolerada. Los cocleatos de amikacina orales se compararán con amikacina libre I.P. Se estudiarán tanto animales infectados como no infectados. Los cocleatos de amikacina orales se compararán con amikacina libre I.P. Se estudiarán tanto animales infectados como no infectados. Se medirá el suero para determinar la creatinina y el nitrógeno ureico en sangre (nefrotoxicidad) y se obtendrán los riñones (para nefrotoxicidad) y el oído interno (para ototoxicidad) para el examen de histopatología.

Se evaluará la dosis óptima. La dosis parenteral eficaz de AK oscila desde 50 hasta 100 mg/kg/día de peso en ratones. Se evaluará el efecto de 10, 25, 50 y 100 mg/kg/día dados por vía oral como una preparación de cocleato. El tratamiento se administrará durante 4 semanas, después de esto se sacrificará a los ratones y se determinará la carga bacteriana en bazo e hígado. Se obtendrán los órganos, se homogenizarán, se diluirán en serie y se sembrarán en placa para determinar la UFC sobre placas de agar Middlebrook 7H11 con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC). Se infectarán ratones negros C57/BL6 por vía intravenosa (vena de la cola) con 0,1 ml

de una suspensión que contiene 10^7 *M. avium* cepa 101, una cepa virulenta en ratones (Bermúdez LE, *et al.*, AAC 45: 2210, 2001). Una semana después de la infección se sacrificará un grupo de 8 ratones y se determinarán las unidades formadoras de colonias bacterianas (UFC) en hígado y bazo, para establecer el inóculo de la infección. A los ratones restantes (12 ratones/grupo experimental) se les administrará tratamiento según los siguientes grupos: a. infectado, no tratado; b. infectado, 10 mg/kg/día, por vía oral; c. infectado, 25 mg/kg/día, por vía oral; d. infectado, 50 mg/kg/día, por vía oral; e. infectado, 100 mg/kg/día, por vía oral; f. infectado, amikacina libre, 100 mg/kg/día, por vía oral; g. infectado, cocleato vacío; y h. infectado, amikacina libre, 100 mg/kg/día, intraperitoneal, Gold-Standard; para un total de 104 ratones. Los ratones se tratarán durante 4 semanas, y luego se sacrificarán. Se determinará la carga bacteriana en el hígado y el bazo y se comparará con la UFC/órgano a las 4 semanas y a la semana 0, antes del inicio del tratamiento. Se monitorizarán los ratones para determinar los efectos secundarios asociados al tratamiento. Los datos se interpretarán según las comparaciones. Cuando se compara la carga en órganos entre grupos experimentales tras 4 semanas de tratamiento, la disminución en la UFC/órgano en relación con el control no tratado significa que el medicamento tiene un efecto bacteriostático. La disminución en la UFC/órgano en relación con la UFC/órgano a tiempo 0, significará una actividad bactericida. Los resultados y comparaciones se analizarán usando la prueba de la *t* de Student y ANOVA. Doce ratones por grupo dan una potencia de 0,90 para el experimento.

g. Determinación de la eficacia de Amkcch en un modelo de pulmón de infección por *M. avium*

M. avium infecta al huésped usando dos vías diferentes. Una es la vía gastrointestinal, desde donde las bacterias pueden diseminarse o/y producir la infección de los ganglios linfáticos. La otra es la vía respiratoria, mediante la cual la bacteria produce la infección en individuos con estados pulmonares crónicos (bronquiectasia, enfisema, fibrosis quística). Debido a que la última vía de infección es común en individuos con enfermedad de pulmón subyacente, y debido a que la infección pulmonar se asocia con la formación de biopelícula (Carter G, *et al.*, AAC 48:4907, 2004; Yamazaki Y, *et al.* Cell Microbiol, 8: 808, 2006), la prueba de la preparación de cocleato-AK en un modelo animal de enfermedad pulmonar por *M. avium* es importante.

El experimento se realizará como se describió previamente (Yamazaki *et al.*, Cell Microbiol 8: 808, 2006; Bermúdez LE *et al.* J Infect Dis 2007). De manera breve, se suministrarán 0,1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias de *M. avium* a las fosas nasales de ratones C57BL/6 y se permitirá a la infección establecerse durante dos semanas. Se sacrificará un grupo de 8 ratones y se determinará el inóculo inicial en los pulmones. Luego se iniciará el tratamiento según los siguientes grupos experimentales: a. infectado, sin tratamiento; b. infectado, amikacina libre 100 mg/kg/día intraperitoneal, Gold Standard; c. infectado, cocleato-AK, 100 mg/kg/día (u otra dosis eficaz que se determinará en el experimento descrito anteriormente); y d. infectado, cocleato vacío; para un total de 56 ratones.

Los ratones se tratarán durante 4 semanas y luego se sacrificarán. Se obtendrán los pulmones, se homogenizarán, se diluirán en serie y se sembrarán en placa para determinar la carga bacteriana sobre placas de agar Middlebrook 7H11 con OADC. El crecimiento bacteriano se produce entre 10 y 15 días. La carga bacteriana se determinará en el hígado y el bazo y se comparará con la UFC/órgano a las 4 semanas y a la semana 0, antes del inicio de tratamiento. Se monitorizarán los ratones diariamente en busca de toxicidad y efectos secundarios. Los datos se interpretarán según las comparaciones. Al comparar la carga en órganos entre grupos experimentales después de 4 semanas de tratamiento, la disminución en UFC/órgano en relación con el control no tratado significa que el medicamento tiene un efecto bacteriostático. La disminución en UFC/órgano en relación con la UFC/órgano a tiempo 0, significará actividad bactericida. Los resultados y comparaciones se analizarán usando la prueba de la *t* de Student y ANOVA. Doce ratones por grupo dan una potencia de 0,90 para el experimento.

h. Determinación de la resistencia a Amkcch

Se infectarán ratones C57BL/6 por vía intravenosa con *M. avium* cepa 101 según los siguientes grupos: a. infectado, no tratado y b. infectado, cocleato-AK, para un número total de 70 x 2 grupos + 8 ó 148 ratones. En el día 7 después de la infección, se recogerán 8 ratones para establecer la carga de infección de nivel inicial, y la frecuencia de resistencia a amikacina. Luego, se tratarán los ratones durante 12 semanas con cocleato-AK, por vía oral. Los animales de control no recibirán tratamiento. La frecuencia de resistencia de *M. avium* a amikacina se determinará en las semanas 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Se recogerán bazos y se sembrará homogenato sobre agar 7H11 tanto con amikacina como sin amikacina.

Se tratarán ratones (10 ratones/punto de tiempo) durante varias semanas, y luego se sacrificarán. La carga bacteriana se determinará en el bazo. La frecuencia de resistencia se determinará según se explica en el estudio de diseño. Las colonias que crecen en placas de amikacina se someterán a prueba para determinar MIC de amikacina tal como se informó previamente (Bermúdez *et al.* J Infect Dis 174: 1218, 1996). Los datos se interpretarán según las comparaciones entre órganos sembrados en placa en medio que contiene amikacina y sin amikacina. La aparición de cualquier colonia en el medio que contiene la concentración límite de amikacina significará la presencia de una colonia resistente. El número de UFC resistentes se comparará con el número de UFC resistentes en bacterias obtenidas del bazo antes del tratamiento así como con bacterias obtenidas del bazo en el mismo punto de tiempo. La frecuencia de resistencia a amikacina libre es de 10^{-11} . Los resultados y comparaciones se analizarán usando ANOVA. Se usarán diez ratones por punto de tiempo. El experimento determinará la frecuencia de resistencia a la

preparación oral de cocleato-AK. Es muy probable que sea similar a la frecuencia de resistencia a amikacina libre, pero debido a que la absorción intestinal puede afectar a la concentración sérica, será importante examinar la frecuencia de resistencia.

5 i. Evaluación de Amkcch en combinación con claritromicina y etambutol

10 El tratamiento de la infección por *M.avium*, tanto diseminada como pulmonar, depende de la actividad de pocos fármacos, como claritromicina (o azitromicina) y etambutol. Un macrólido es crucial para un régimen oral eficaz (Chaisson R, *et al.* Ann Intern Med 121: 905, 1994), pero la adición de etambutol da como resultado un efecto sinérgico y disminuye la emergencia de la resistencia a claritromicina (Bermúdez LE, *et al.* J Infect. Dis 174: 1218, 1996).

15 Se administrará cocleato-AK en combinación con claritromicina, etambutol o ambos. Se infectarán ratones C57BL/6 por vía intravenosa según los siguientes grupos: a. infectado, no tratado; b. infectado, cocleato vacío; c. infectado, claritromicina, 100 mg/kg/día; d. infectado, etambutol, 100 mg/kg/día; e. infectado, cocleato-AK, dosis que va a determinarse; f. infectado, claritromicina + etambutol; g. infectado, claritromicina + cocleato-AK; h. infectado, etambutol + cocleato-AK; e i. infectado, claritromicina + etambutol + cocleato-AK; para un total de 116 ratones.

20 Después de 7 días, se recogerán 8 ratones para establecer la carga de infección de nivel inicial en el hígado y el bazo. El tratamiento comenzará y se administrará durante 4 semanas. Después, los ratones se sacrificarán y se cuantificará la carga bacteriana en bazo, hígado y pulmones, sembrando sobre placas de agar Middlebrook 7H11. Se usarán doce ratones por grupo experimental. La carga bacteriana se determinará en el hígado y en el bazo y se comparará con la UFC/órgano a las 4 semanas y a la semana 0, antes del inicio del tratamiento. Se monitorizarán los ratones en una base diaria para determinar los efectos secundarios y la toxicidad. Se interpretarán los datos según las comparaciones. Al comparar la carga en órganos entre grupos experimentales tras 4 semanas de tratamiento, la disminución en UFC/órgano en relación con el control no tratado significa que el medicamento tiene un efecto bacteriostático. La disminución en UFC/órgano en relación con la UFC/órgano a tiempo 0, significará una actividad bactericida. Los resultados y comparaciones se analizarán usando la prueba de la t de Student y ANOVA. Doce ratones por grupo dan una potencia de 0,90 para el experimento. El experimento determinará si la preparación oral de cocleato-AK es sinérgica o/y aditiva a cualquiera de los compuestos usados de manera rutinaria para tratar infecciones por *M.avium*.

35 j. Determinar la actividad de Amkcch contra cepas resistentes a claritromicina

40 Las cepas resistentes a claritromicina o azitromicina de *M.avium* representan un problema importante en el tratamiento del estado. Los macrólidos son muy potentes y un componente clave del tratamiento. La enfermedad producida por una cepa resistente a macrólidos representa un reto para el tratamiento. Se usará un aislado clínico, resistente a claritromicina (cepa MAC184, con una mutación en de A₂₂₇₅ a C₂₂₇₅, MIC de 64 mcg/ml) y con MIC a etambutol de 8 mcg/ml (en comparación con MIC de 4 mcg/ml de una cepa de *M.avium* susceptible, tal como MAC101) para infectar ratones negros C57BL/6 por vía intravenosa según los siguientes grupos: a. infectado, no tratado; b. infectado, claritromicina 100 mg/kg/día; c. infectado, etambutol 100 mg/kg/día; d. infectado, cocleato-AK, dosis que va a determinarse; e. infectado, etambutol + cocleato-AK; f. infectado, etambutol + amikacina libre (IM); y g. infectado, cocleato vacío; para un total de 92 ratones. Después de 7 días, se recogerán 8 para determinar la carga bacteriana en bazo, hígado y pulmones antes del tratamiento. Luego, se iniciará el tratamiento. Se tratarán ratones (12/grupo experimental) durante 4 semanas, y luego se sacrificarán. La carga bacteriana se determinará en el hígado, bazo y pulmón y se comparará con la UFC/órgano a las 4 semanas y a la semana 0, antes del inicio del tratamiento. Se monitorizarán los ratones en una base diaria para determinar los efectos secundarios y la toxicidad. Se interpretarán los datos según las comparaciones. Al comparar la carga en órganos entre grupos experimentales tras 4 semanas de tratamiento, la disminución en UFC/órgano en relación con el control no tratado significa que el medicamento tiene un efecto bacteriostático. La disminución en UFC/órgano en relación con la UFC/órgano a tiempo 0, significará una actividad bactericida. Los resultados y comparaciones se analizarán usando la prueba de la t de Student y ANOVA. Doce ratones por grupo dan una potencia de 0,90 para el experimento.

55 El experimento determinará si la preparación oral de cocleato-AK es activa contra *M.avium* resistente a claritromicina (y azitromicina). Estos resultados son importantes porque determinarán si el cocleato-AK tiene actividad contra cepas resistentes a claritromicina y si la actividad de la preparación de cocleato es comparable a la amikacina libre a la misma dosis.

60 k. Evaluación de toxicidad y concentración sérica y en tejidos de la preparación de cocleato-AK

65 Los ratones infectados (por vía sistémica) o no infectados recibirán tratamiento con amikacina libre y 100 mg/kg/día de cocleato oral según los siguientes grupos: a. no infectado, amikacina libre intraperitoneal durante 4 semanas; b. no infectado, cocleato-AK oral, durante 4 semanas; c. infectado, amikacina libre intraperitoneal durante 4 semanas; d. infectado, cocleato-AK oral durante 4 semanas; y ratones infectados, no tratados, para estudios de toxicidad; para un total de 50 ratones.

Se evaluará la distribución y toxicidad de amikacina mediante histopatología, y los niveles séricos y en tejidos se determinarán mediante HPLC. Cada grupo experimental tendrá 10 ratones. Para los niveles de fármaco, se obtendrán suero, pulmones y bazo. Para la evaluación de la toxicidad, se obtendrán riñones y oído interno para examen de histopatología.

5

l. Evaluación de Amkch en el tratamiento de micobacterias no tuberculosas (NTM)

Las micobacterias no tuberculosas (NTM) son organismos comunes en el suelo y el medio ambiente y el agua potable que se han asociado con enfermedad pulmonar en grupos de pacientes seleccionados. El tratamiento requiere regímenes multifármaco prolongados que pueden ser mal tolerados y poco eficaces, especialmente en pacientes con enfermedad grave o en aquellos en los que han fallado los intentos de tratamiento anteriores. Existen muy pocos ensayos clínicos para respaldar las recomendaciones de tratamiento actuales y no se han evaluado nuevos fármacos para esta enfermedad en muchos años. La amikacina es un fármaco establecido que es eficaz contra una variedad de NTM. Sin embargo, su uso se limita por la necesidad de administrarlo por vía intravenosa y por la toxicidad a la audición, al equilibrio y a la función renal. La nanococleatoamikacina es una formulación nueva que ofrece tanto biodisponibilidad oral como potencial para toxicidad reducida. Los estudios preclínicos sugieren una mayor eficacia contra el complejo *Mycobacterium avium* en comparación con la amikacina lista para usar.

10

15

Puede llevarse a cabo un estudio para evaluar la seguridad y la eficacia de nanococleatoamikacina en 34 pacientes adultos (30 evaluables + el 12% de abandonos) con infecciones pulmonares debidas al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) o *Mycobacterium abscessus* que no han respondido a regímenes convencionales de tratamiento basados en pautas. Los participantes que han estado en un régimen de fármaco micobacteriano estable durante al menos 3 meses con cultivos positivos persistentes se someterán a una evaluación de detección. Luego se estratificarán basándose en la presencia o ausencia de fibrosis quística y se aleatorizarán en una razón de 2:1 para recibir o bien 84 días de nanococleatoamikacina oral o bien 84 días de placebo oral. Esto se seguirá por un periodo de marcaje abierto de 84 días durante el cual todos los participantes recibirán la administración de dosis diaria de nanococleatoamikacina. Los participantes continuarán de manera adicional con los mismos fármacos antimicobacterianos que estaban tomando antes del comienzo del estudio. La visita de detección se producirá dentro de los 14 días anteriores al día 1 del estudio. Todos los sujetos serán seguidos durante 28 días tras la última dosis del fármaco del estudio. Las visitas de referencia y de revisión de 28 días realizadas durante el periodo de estudio evaluarán los parámetros de laboratorio clínico, las pruebas de audiología, los acontecimientos adversos clínicos y la función pulmonar para determinar la seguridad y la tolerabilidad cualitativa y cuantitativa de la nanococleatoamikacina. Se recogerá esputo expectorado para determinar cambios en el frotis micobacteriano y en el estado del cultivo. Se realizará tomografía computerizada del tórax en la referencia y en los días 84 y 168 de la administración de dosis. Se medirá la distancia andada en seis minutos, la saturación de oxígeno y la espirometría, se evaluarán los síntomas usando la puntuación de gravedad de síntomas pulmonares, y se evaluará la calidad pulmonar de vida usando el cuestionario respiratorio de St. George (SGRQ) en cada visita. Se recogerán muestras de esputo, sangre y orina para evaluar las concentraciones del fármaco. Los objetivos primarios del estudio serán: 1) evaluar la seguridad y la tolerabilidad de administración de 84 días de nanococleatoamikacina frente a placebo; 2) evaluar la eficacia de 84 días de nanococleatoamikacina frente a placebo para enfermedad pulmonar NTM recalcitrante. Los objetivos secundarios serán: 1) evaluar la seguridad y la eficacia de administración de 84 días frente a 168 días de nanococleatoamikacina; 2) evaluar la farmacocinética (PK) de nanococleatoamikacina; y 3) evaluar la seguridad a largo plazo de nanococleatoamikacina (168 días). Los resultados primarios para este estudio son: 1) la frecuencia de tratamiento relación acontecimientos adversos a lo largo de 84 días de administración de dosis diaria; en particular, esto incluye los siguientes sucesos: a. acontecimientos adversos que conducen al abandono permanente del medicamento del estudio; b. acontecimientos adversos audiovestibulares; c. acontecimientos adversos renales; d. acontecimientos adversos graves a lo largo de los 84 días de administración de fármaco del estudio; y 2) proporción de pacientes en nanococleatoamikacina que logran una reducción en el crecimiento de cultivo micobacteriano de esputo a los 84 días en comparación con el placebo. Los resultados secundarios incluyen: 1) proporción de pacientes en nanococleatoamikacina que logran una reducción en organismos observados en el frotis micobacteriano de esputo a los 84 días en nanococleatoamikacina en comparación con el placebo; 2) proporción con conversión de cultivo a negativo en los días 84 y 168 de nanococleatoamikacina en comparación con los 84 días de placebo; 3) tiempo para la reducción en el crecimiento de cultivo micobacteriano de esputo; 4) tiempo necesario para fármacos antimicobacterianos de "rescate"; 5) tiempo para y duración del tratamiento para exacerbaciones bacterianas agudas de bronquiectasia; 6) cambio en las anomalías de escáner de tomografía computerizada a los 84 y 168 días; 7) cambio en la calidad de vida usando el cuestionario respiratorio de St. George a los 84 y 168 días; 8) cambio en la puntuación de gravedad de síntomas pulmonares a los 84 y 168 días; 9) cambio en la distancia andada en 6 minutos y la saturación de oxígeno a los 84 y 168 días.

60

m. Evaluación de formulaciones de cocleato de aminoglucósido orales para biodefensa

La tularemia y la brucelosis son enfermedades graves en humanos, producidas por la infección con *Francisella tularensis* y *Brucella abortus*, respectivamente. Tales infecciones por microorganismos son difíciles de tratar debido a su capacidad de evadir la respuesta inmunitaria innata y replicarse dentro de fagocitos. Los aminoglucósidos, tales como amikacina y gentamicina, inhiben de forma eficaz el crecimiento de estos microorganismos *in vitro*, pero tienen

65

un uso terapéutico limitado debido a la vía I.V. rigurosa de administración, toxicidad sustancial y capacidad limitada para lograr concentraciones intracelulares terapéuticas. Las formulaciones de cocleato de aminoglucósido podrían conferir biodisponibilidad oral, baja toxicidad y aumentar el índice terapéutico de los aminoglucósidos. Esto puede aumentar sustancialmente la utilidad de los aminoglucósidos en el tratamiento de *Francisella tularensis* y *Brucella abortus*, e infecciones intracelulares bacterianas potencialmente adicionales.

La primera generación de formulaciones de cocleatos de amikacina y cocleatos de gentamicina ya se ha producido. Por ejemplo, una suspensión de liposomas de fosfatidilserina derivada de semilla de soja (SPS) en agua (10 mg de lípido/ml) se forma añadiendo SPS en polvo seca a agua y mezclando durante 15 minutos. Luego se filtra la suspensión de liposomas a través de un filtro de 5 μ m para retirar cualquier material insoluble y producir una población más uniforme de liposomas. Se prepara una disolución de aminoglucósido en agua (habitualmente $\sim 10\times$ la concentración final deseada). Se añade una décima parte del volumen de la disolución de aminoglucósido gota a gota a la suspensión de liposomas. La razón final de lípido:fármaco varía entre 5:1 y 20:1. Se deja mezclar la suspensión de aminoglucósido-liposomas durante 10 minutos. Para formar cocleatos, se añade gota a gota una disolución de CaCl₂ 0,1 M mezclándola con la suspensión de aminoglucósido-liposomas. Se deja mezclar la suspensión final durante 10-15 minutos. La formulación final aparece como una suspensión particulada, blanca y fina. Visualizada en el microscopio óptico un aumento de 1.000x, la formulación se compone de pequeños agregados de cocleato. La eficiencia del fármaco cargado en los cocleatos se determina sedimentando los cocleatos y cuantificando la cantidad de aminoglucósido en el sedimento y el sobrenadante usando un ensayo de colorimetría basado en ninhidrina.

Pueden usarse para los experimentos una línea celular de macrófagos peritoneales de ratón (Raw 246.7), que es una línea celular normalmente usada, y THP-1, una línea de macrófagos humanos. Las células se cultivarán en DMEM y RPMI-1640, respectivamente, complementados con suero bovino fetal inactivado con calor al 5%. Se establecerán monocapas de macrófagos añadiendo 10^5 macrófagos a una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Se necesitarán monocapas con macrófagos de THP-1 que van a tratarse con éster forbólico, para inducir la maduración y la adhesión al plástico. Después de 24 horas, se infectarán las monocapas con o bien 10^5 *F. tularensis* o *B. abortus*. Se permitirá que se produzca la infección durante 1 hora, y luego se retirarán las bacterias extracelulares lavando. Se lisarán algunos de los contenidos de los pocillos y se sembrarán sobre placa de agar 7H10 Middlebrook, para determinar el inóculo intracelular de la bacteria. Los pocillos restantes se tratarán diariamente durante 5 días con: 1- gentamicina libre; o 2- amikacina libre; ó 3- preparaciones de cocleato de gentamicina; ó 4- preparaciones de amikacina de cocleato según los siguientes grupos: 1. control, recogida a las 24 h; 2. control, recogida en el día 5; 3. amikacina libre; 4. cocleato amikacina; 5. gentamicina libre; 6. cocleato de gentamicina; 7. cocleato libre; y 8. doxiciclina libre (para *Brucella*). Tras el tratamiento, se lisarán las monocapas de células y se sembrarán en placa el lisado en agar 7H10 para cuantificar la carga intracelular.

Los ensayos se repetirán tres veces. Los resultados se obtendrán como unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de lisado de macrófagos. Se realizarán comparaciones entre el número de bacterias en monocapas lisadas antes del tratamiento (tiempo 0) y la carga bacteriana en monocapas lisadas después de 5 días de tratamiento. Los resultados se interpretarán como actividad bactericida cuando el número de bacterias en el grupo experimental tratado sea más pequeño que el número de bacterias dentro de las células a tiempo 0, y como actividad bacteriostática cuando el número de bacterias a los 5 días de tratamiento sea más pequeño que el control no tratado, en el mismo punto de tiempo, pero mayor que el número de bacterias a tiempo 0.

Francisella tularensis es muy infecciosa. Un número pequeño (más o menos 10-50 organismos) pueden producir la enfermedad. Si *F. tularensis* se usara como arma, las bacterias probablemente se transportarían por el aire para su exposición por inhalación. Las personas que inhalan un aerosol infeccioso pueden experimentar generalmente enfermedades respiratorias graves, incluyendo neumonía e infección sistémica potencialmente mortales, si no se tratan. Por definición del CDC, *Francisella tularensis* se considera un patógeno de categoría A; las especies de *Brucella* se consideran patógenos de categoría B. Por tanto, los experimentos con *Francisella tularensis* y *Brucella abortus* se llevarán a cabo en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (BSL-3).

Los experimentos preliminares se han realizado según el siguiente protocolo: 1. macrófagos Raw 246.7 a 10^5 por monocapa; 2. *F. tularensis* LVS: 5×10^5 bacterias/monocapa; 3. permitir que ocurra la infección durante 1 h; 4. lavar los pocillos para retirar las bacterias que no fueron ingeridas por macrófagos; 5. lisar algunos pocillos/monocapas antes del comienzo del tratamiento, para estabilizar el número de bacterias intracelulares; 6. comenzar el tratamiento de las monocapas con compuestos; 7. después de 4 días, parar el tratamiento; 8. dejar 1 día sin añadir tratamiento a los pocillos; 9. lisar monocapas con agua; 10. dilución en serie; y 11. sembrar en placa el lisado sobre placas de agar de chocolate para determinar el número de UFC intracelulares (UFC/ml). Los resultados se presentan en la tabla 7.

Tabla 7: Recuentos bacterianos después de que macrófagos infectados por *F. tularensis* LVS se trataran con Gecch

Grupos de tratamiento	Día 0	Día 4	valor de p
1 h control (sin tratamiento)	$2 \pm 0,4 \times 10^4$	-	-

Gentamicina (NaCl 0 M) 2 µg/ml	-	$1,5 \pm 0,5 \times 10^3$	(1) (2) (3)
Gentamicina (NaCl 0,066 M) 2 µg/ml	-	$8,6 \pm 0,4 \times 10^2$	(1) (2) (3)
Gentamicina (NaCl 0,33 M) 2 µg/ml	-	$6,9 \pm 0,2 \times 10^2$	(1) (2) (3) (4)
Gentamicina (NaCl 0,6 M) 2 µg/ml	-	$5,1 \pm 0,3 \times 10^2$	(1) (2) (3) (4)
Gentamicina (libre) 2 µg/ml	-	$9,3 \pm 0,3 \times 10^2$	(1) (2) (3)
Amikacina (NaCl 0 M) 4 µg/ml	-	$8,9 \pm 0,4 \times 10^2$	(1) (2) (3)
Amikacina (NaCl 0,066 M) 4 µg/ml	-	$6,4 \pm 0,5 \times 10^2$	(1) (2) (3)
Amikacina (NaCl 0,33 M) 4 µg/ml	-	$4,7 \pm 0,3 \times 10^2$	(1) (2) (3) (4)
Amikacina (NaCl 0,66 M) 4 µg/ml	-	$2,4 \pm 0,2 \times 10^2$	(1) (2) (3) (4)
Amikacina (libre) 4 µg/ml	-	$7,6 \pm 0,3 \times 10^3$	(1) (2) (3)
Cocleatos vacíos de control	-	$2,7 \pm 0,5 \times 10^6$	(1) (2) (3)
Control sin tratamiento	-	$3,0 \pm 0,3 \times 10^6$	(1) (2) (3)

(1) $p < 0,05$ en comparación con el control de 1 h

(2) $p < 0,05$ en comparación con el control sin tratamiento en el día 4

5

(3) $p < 0,05$ en comparación con el cocleato vacío

(4) $p < 0,05$ en comparación con el fármaco libre

10 Ejemplo 4: Formulaciones de cocleato para respuestas inmunitarias mejoradas y protección contra la infección microbiana (parte de de la divulgación y la invención)

15 Los cocleatos son cristales lipídicos multicapa, estables y anhidros que se forman de manera espontánea bajo la interacción de fosfatidilserina y calcio. Las formulaciones de cocleato permanecen intactas en los fluidos fisiológicos, incluyendo las secreciones mucosas, el plasma y el fluido gastrointestinal. Por tanto, pueden usarse cocleatos para mediar la administración de compuestos biológicamente activos mediante muchas vías administración, incluyendo oral, mucosa e intravenosa.

20 Se prepararon formulaciones de cocleato asociando un API con una suspensión de liposomas de fosfatidilserina seguido por la adición gota a gota de una disolución de CaCl_2 . Las propiedades del API (hidrofobicidad o carga) se usan para formar el producto intermedio liposoma-API. Todos los estudios se informaron en modelos de ratón. La administración oral de formulaciones de cocleato-API, que son suspensiones cristalinas, fue mediante sonda oral (habitualmente 0,1 ml).

25 *Respuestas inmunitarias obtenidas:* Se prepararon cocleatos de proteína de la gripe extrayendo la envuelta del virión de la gripe que contiene proteínas HA y NA e incorporando estas proteínas en la matriz del cocleato. Se administraron cocleatos de proteína de la gripe o bien por vía intramuscular o bien por vía oral. Se midieron los anticuerpos circulantes contra el virus de la gripe y la protección contra la exposición al virus. Las figuras 11 y 12 demuestran que la administración oral induce respuestas inmunitarias sistémicas y la detección de anticuerpos neutralizantes indica la estructura intacta de proteínas de la gripe presentadas al sistema inmunitario y administradas por los cocleatos.

35 Además, la administración oral de cocleatos de proteína que contienen proteínas de la envuelta del virus de la gripe dio como resultado una inmunidad humoral y celular sistémica fuerte, incluyendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes, y la protección contra la exposición al virus intranasal. La administración oral de cocleatos de ADN que contienen un plásmido que expresa los genes *env*, *tat* y *rev* del virus VIH dio como resultado una inmunidad humoral y celular sistémica fuerte contra gp160.

40 *Protección contra la infección microbiana* – Una dosis única de cocleatos de ARNip que seleccionan como diana el virus de la gripe dio como resultado una reducción de 200 veces (administración intranasal) y de 20 veces (administración intravenosa) en el título del virus en el pulmón. La administración oral de cocleatos de amikacina dio como resultado la protección contra la infección por *M. avium*. La administración oral de cocleatos de anfotericina B dio como resultado la protección contra la infección por *Aspergillus* y *Candida*.

45 Los resultados indican que la administración oral de formulaciones de cocleato de proteínas y plásmidos de ADN dio como resultado respuestas inmunitarias celulares y humorales sistémicas, lo que demuestra que los cocleatos protegen estas moléculas de la digestión en el tracto GI y median la administración intracelular. La administración oral de formulaciones de cocleato de fármacos de molécula pequeña da como resultado la administración sistémica

terapéutica. Estos datos proporcionan una sólida base experimental para investigar el uso de cocleatos para la administración oral de proteínas y oligonucleótidos terapéuticos.

Ejemplo 5: Formulaciones de cocleato para encocleación mejorada de moléculas hidrófilas

5 Los cocleatos son cristales lipídicos multicapa, estables y anhidros que se forman de manera espontánea bajo la interacción de fosfatidilserina y calcio. Las formulaciones de cocleato permanecen intactas en los fluidos fisiológicos, incluyendo las secreciones mucosas, el plasma y el fluido gastrointestinal, mediando así la administración de compuestos biológicamente activos por muchas vías de administración, incluyendo oral, mucosa e intravenosa. 10 Inicialmente, los cocleatos se han usado para formular fármacos hidrófobos. Por ejemplo, han entrado en ensayos clínicos en humanos formulaciones orales de anfotericina B (AmB) encocleada. Sin embargo, ha sido difícil encoclear de manera apreciable moléculas hidrófilas o moléculas grandes con dominios hidrófilos.

15 Específicamente, las formulaciones de cocleato se han preparado tradicionalmente asociando un API con una suspensión de vesículas de fosfatidilserina seguido por la adición gota a gota de una disolución de CaCl_2 . Se usó AmB para representar un fármaco hidrófobo típico, mientras que amikacina y gentamicina son fármacos hidrófilos. Se ha descubierto en el presente documento que pueden formularse moléculas hidrófilas o moléculas grandes con dominios hidrófilos en cocleatos asociando el API con un dominio lipídico que no interacciona con calcio y actúa como una “balsa” que permanece intacta e incrustada dentro de la matriz del cristal de cocleato (figuras 13A-13B). 20

Por ejemplo, se usó para fabricar cocleatos la incorporación de fosfatidilserina (PS) combinada con dioleoilPS pura al 99,9%, PS de soja pura al 99,9%, PS de soja al 75% y PS de soja al 50%. La composición lipídica de PS pura al 99,9% se modificó por la adición de esfingomielina, fosfatidilcolina y/o colesterol. Se determinó la eficiencia de la encocleación evaluando la concentración de fármaco en el sobrenadante después de la centrifugación. 25

La eficiencia de la encocleación de AmB es mayor del 85%, y fue independiente de la composición lipídica de las vesículas de PS. En cambio, las eficiencias de encapsulación tanto de amikacina como de gentamicina fueron solo del 15%-20% usando PS pura al 99,9% en comparación con el 60%-65% usando PS de soja al 50%. La adición de esfingomielina y/o fosfatidilcolina a vesículas de PS pura aumentó las eficiencias de encocleación próximas a las del PS de soja al 50%. Los resultados se presentan en la figura 14. 30

En resumen, la adición de Ca^{2+} a vesículas de PS induce la formación de cocleatos, un complejo “anhidro” de membranas estrechamente apiladas con cadenas de acilo cristalinas altamente ordenadas y una temperatura de transición muy alta. Las eficiencias de encocleación de moléculas hidrófobas, que pueden insertarse dentro de las bicapas de las cadenas de acilo son, dentro de amplios límites, independientes de la composición de la vesícula de PS. Pueden formularse moléculas hidrófilas en cocleatos asociando el API con un dominio lipídico que no interacciona con calcio y actúa como una “balsa” que permanece intacta, fluida e incrustada dentro de la matriz del cristal de calcio-PS. 35

REIVINDICACIONES

1. Composición de cocleato que comprende una población de cocleatos, en la que los cocleatos comprenden:
 - 5 a) un primer lípido cargado negativamente;
 - b) un catión, en el que el catión es un catión divalente seleccionado del grupo que consiste en cationes de calcio, zinc, bario y magnesio;
 - 10 c) un segundo lípido neutro; y
 - d) una molécula biológicamente relevante, en la que la molécula biológicamente relevante es un aminoglucósido;

15 en la que la razón del primer lípido cargado negativamente con respecto al segundo lípido neutro está entre 1:1 y 9:1;

en la que el primer lípido cargado negativamente es fosfatidilserina y comprende al menos el 50% del lípido total; y

20 en la que el segundo lípido neutro es fosfatidilcolina o esfingomielina.
2. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que la razón del primer lípido cargado negativamente con respecto al segundo lípido neutro está entre 4:1 y 9:1.
- 25 3. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que el segundo lípido comprende lípido capaz de formar enlaces de hidrógeno con la molécula biológicamente relevante.
4. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que el segundo lípido está incrustado entre el primer lípido cargado negativamente.
- 30 5. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que el lípido cargado negativamente comprende dioleoil PS (DOPS) o fosfatidilserina derivada de soja (PS de soja).
- 35 6. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que los cocleatos comprenden además una pequeña cantidad de un tercer lípido, en la que el tercer lípido se selecciona del grupo que consiste en un lípido zwitteriónico, un lípido pegilado, un lípido catiónico o un lípido policatiónico.
- 40 7. Composición de cocleato según la reivindicación 1, en la que el aminoglucósido se selecciona del grupo que consiste en gentamicina, netilmicina, tobramicina, amikacina, kanamicina A, kanamicina B, neomicina, paromomicina, neamina, estreptomycin, dihidroestreptomycin, apramicina, ribostamicina o espectinomycin.
- 45 8. Composición de cocleato según la reivindicación 1, que comprende además un inhibidor de la agregación.
9. Composición de cocleato según la reivindicación 8, en la que el inhibidor de la agregación es cloruro de sodio.
- 50 10. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la composición de cocleato según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Método de elaboración de la composición de cocleato según la reivindicación 1 que comprende:
 - 55 a) mezclar el aminoglucósido con un liposoma que comprende un primer lípido cargado negativamente y un segundo lípido en el que el segundo lípido es un segundo lípido neutro; y
 - b) añadir un catión, en el que el catión es un catión divalente seleccionado del grupo que consiste en cationes de calcio, zinc, bario y magnesio, para elaborar la composición de cocleato,

60 en el que la razón del primer lípido cargado negativamente con respecto al segundo lípido neutro está entre 1:1 y 9:1;

en el que el primer lípido cargado negativamente es fosfatidilserina y comprende al menos el 50% del lípido total; y

65 en el que el segundo lípido neutro es fosfatidilcolina o esfingomielina.

12. Método según la reivindicación 11, en el que la razón del lípido total con respecto a la molécula biológicamente relevante es al menos 4:1.
- 5 13. Método según la reivindicación 11, en el que el catión de calcio se proporciona a partir de cloruro de calcio, en el que la concentración de cloruro de calcio de la mezcla es de 2 mM a 10 mM.
14. Método según la reivindicación 11, que comprende además una etapa c), en el que un inhibidor de la agregación se mezcla con las composiciones de cocleato.
- 10 15. Composición según la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que comprende la administración de la composición según la reivindicación 1 a un sujeto, en la que el sujeto es cualquier animal, incluyendo un humano, un ratón, una rata, un conejo, un primate no humano o cualquier otro mamífero.
- 15 16. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que la administración es por la vía oral, intranasal, intraocular, intraanal, intravaginal o intrapulmonar.
- 20 17. Composición para su uso según la reivindicación 16, en la que la composición de cocleato comprende además una sal biliar.

Figura 1

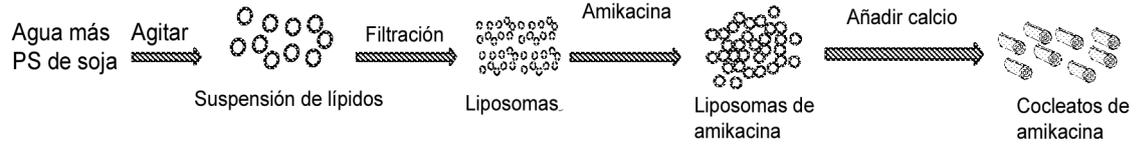


Figura 2

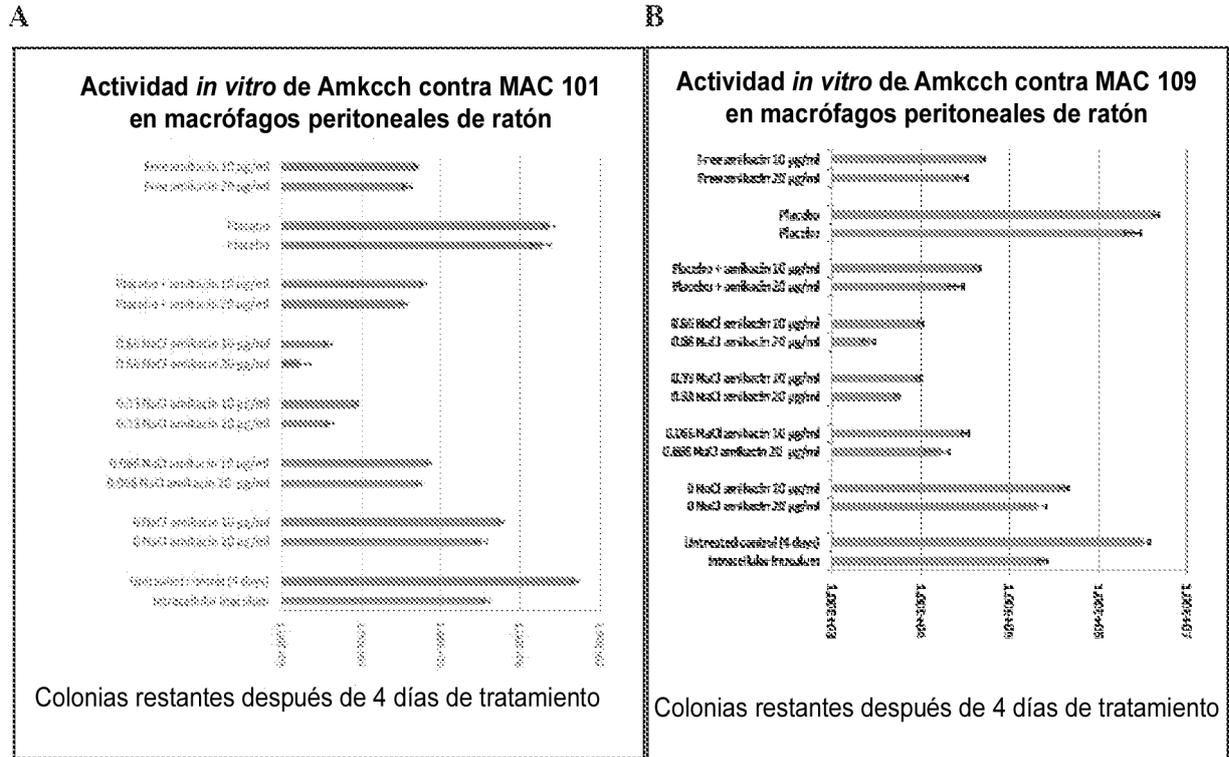
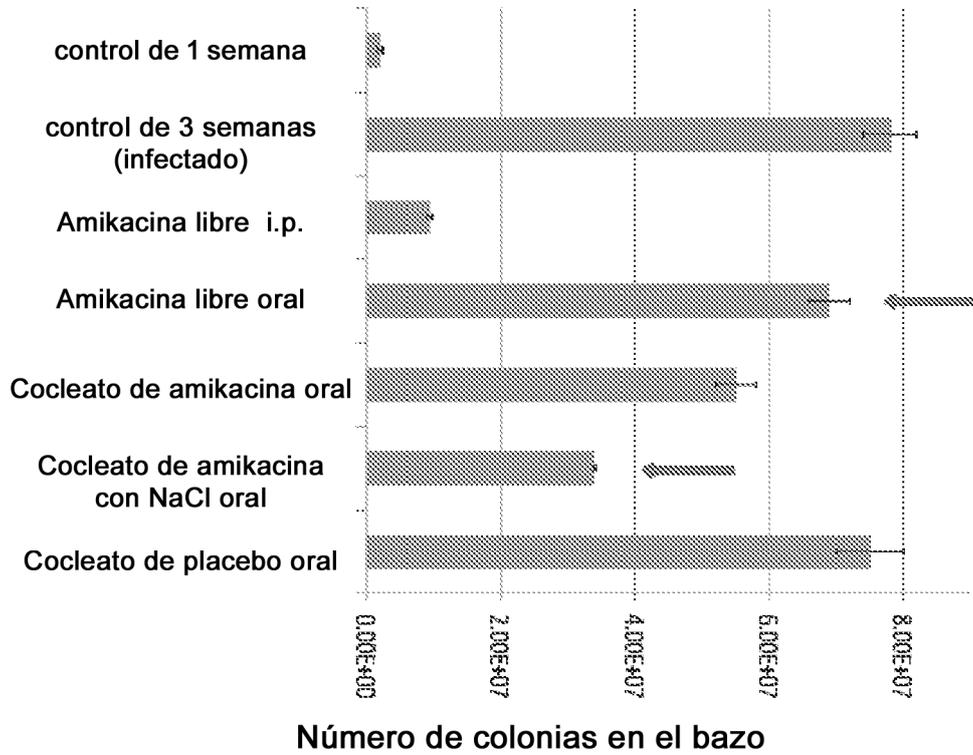


Figura 3

A



B

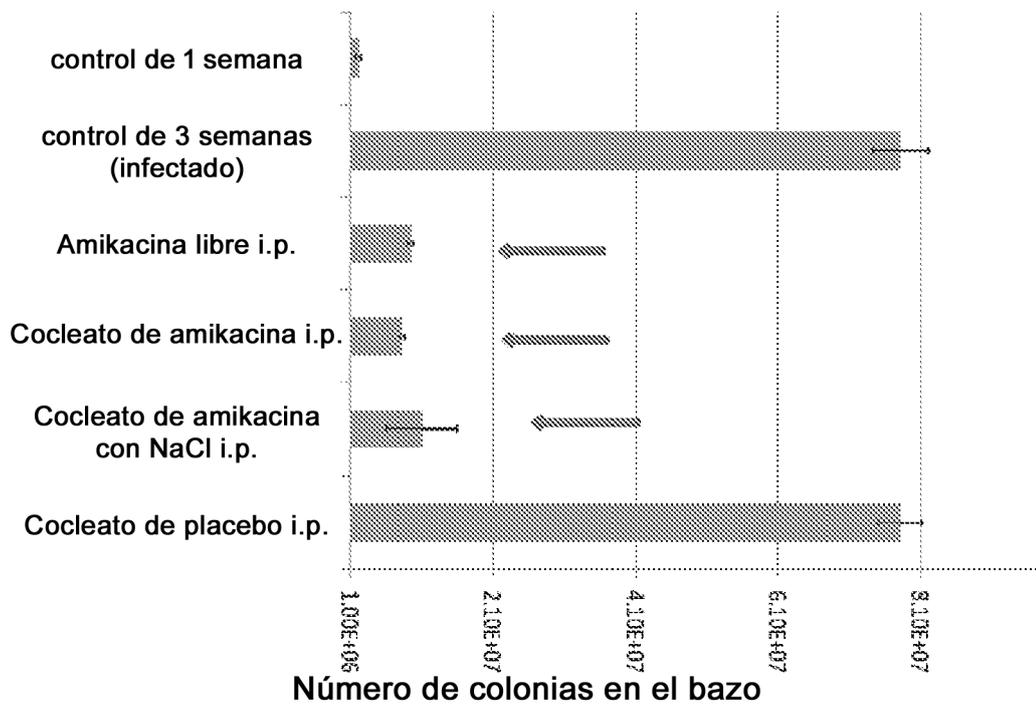


Figura 4

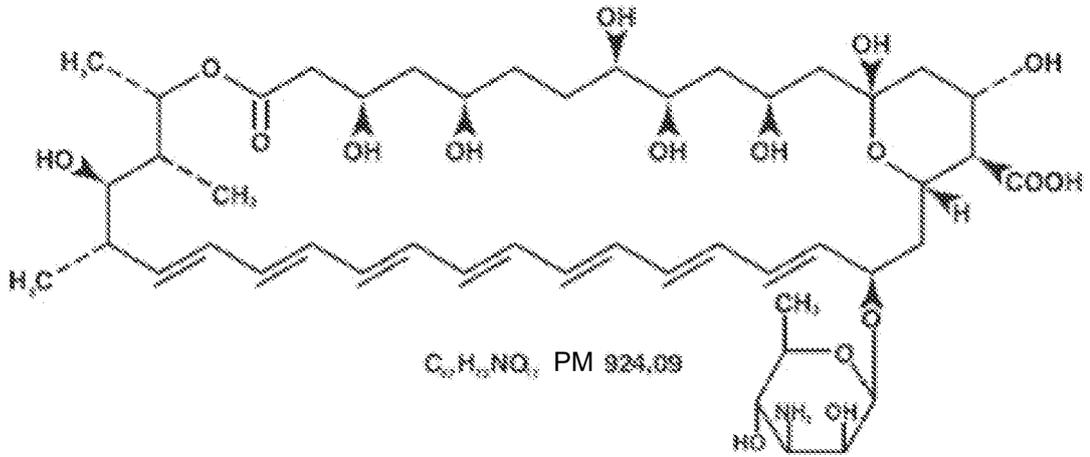


Figura 5

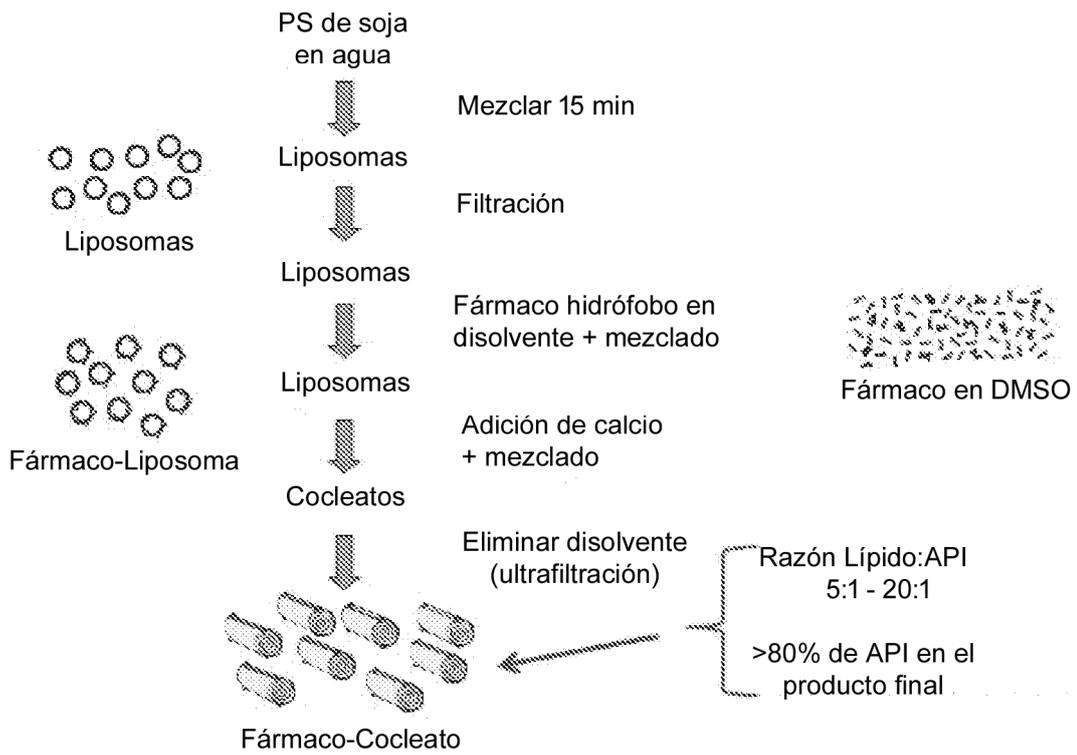


Figura 6

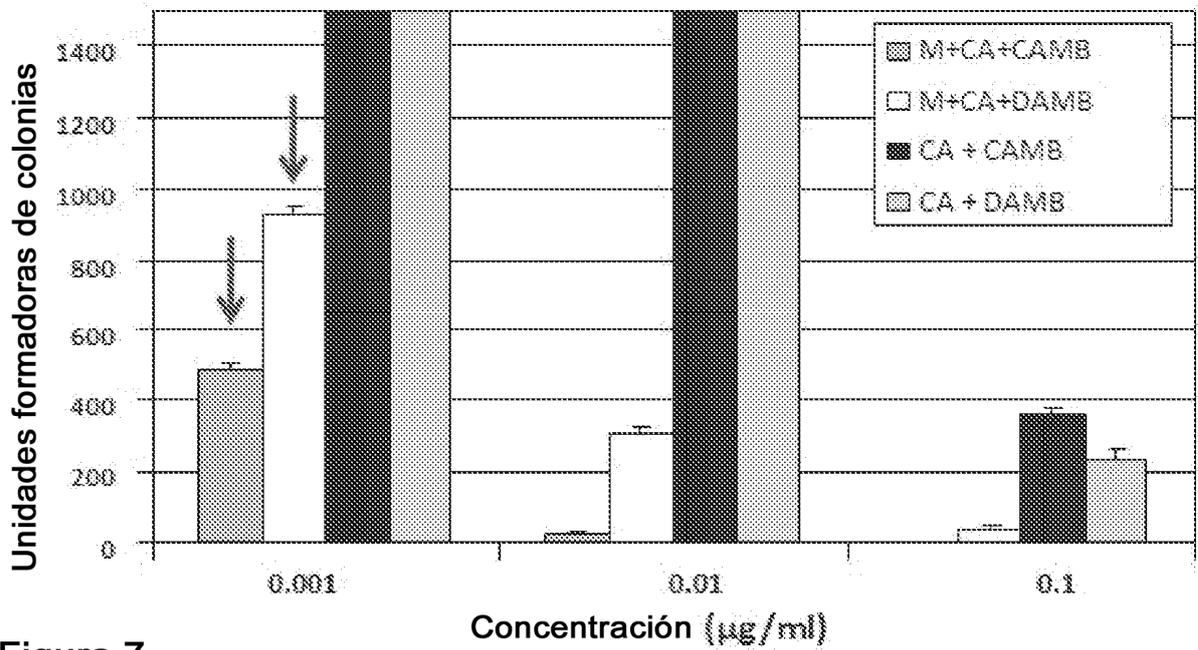
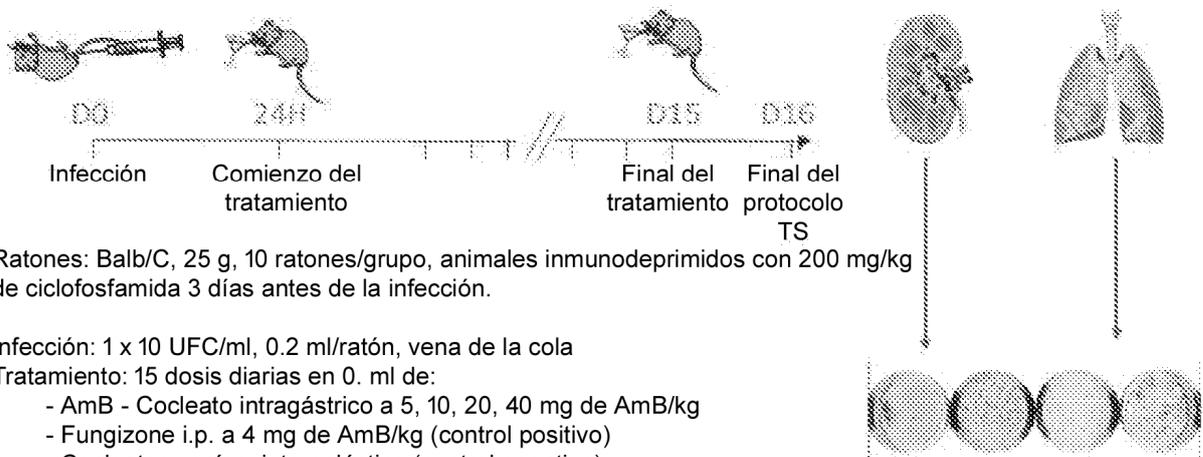


Figura 7



Carga tisular: riñones y pulmones en solución salina, diluciones en serie de recuento de colonias 10x

Figura 8

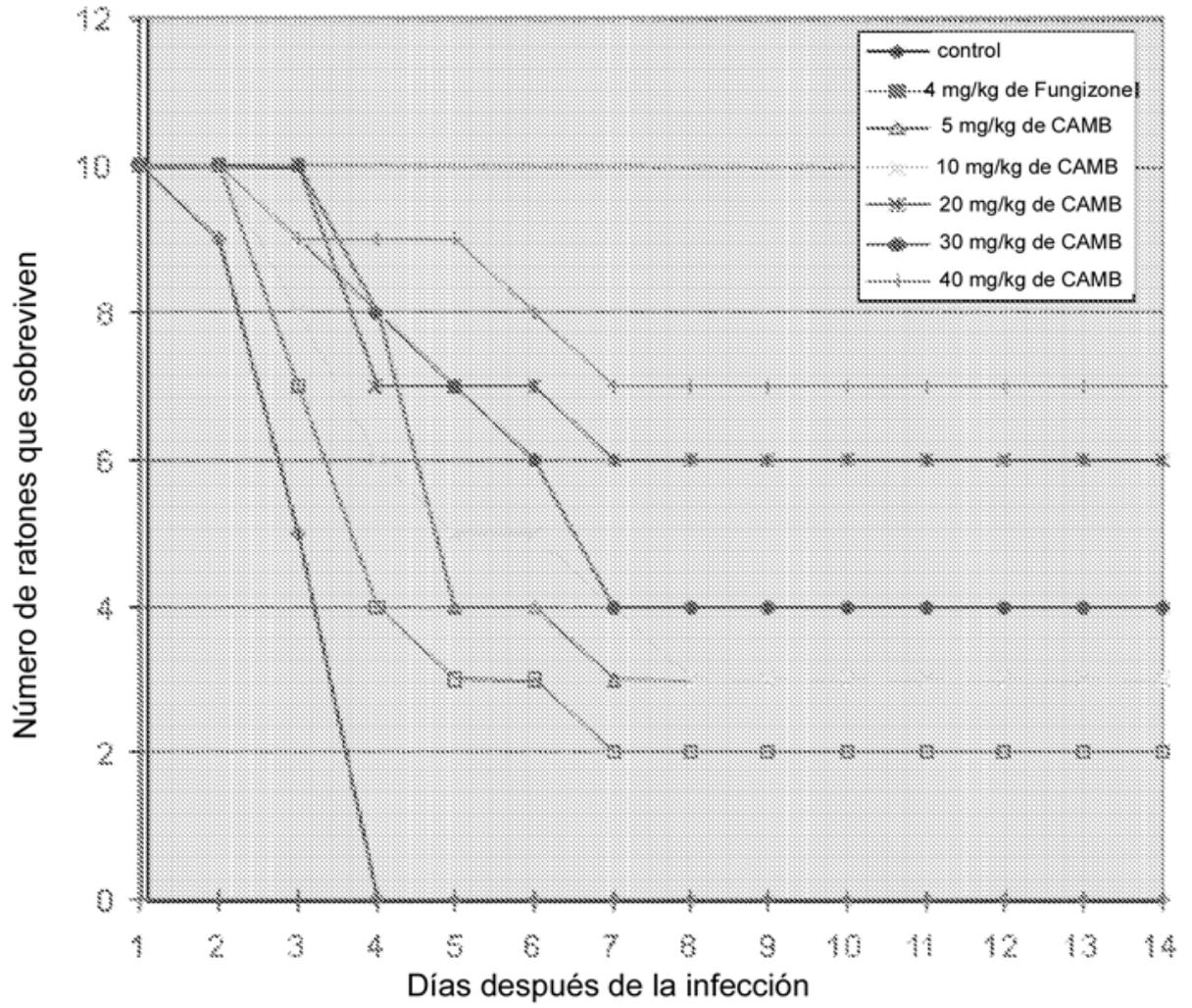


Figura 9

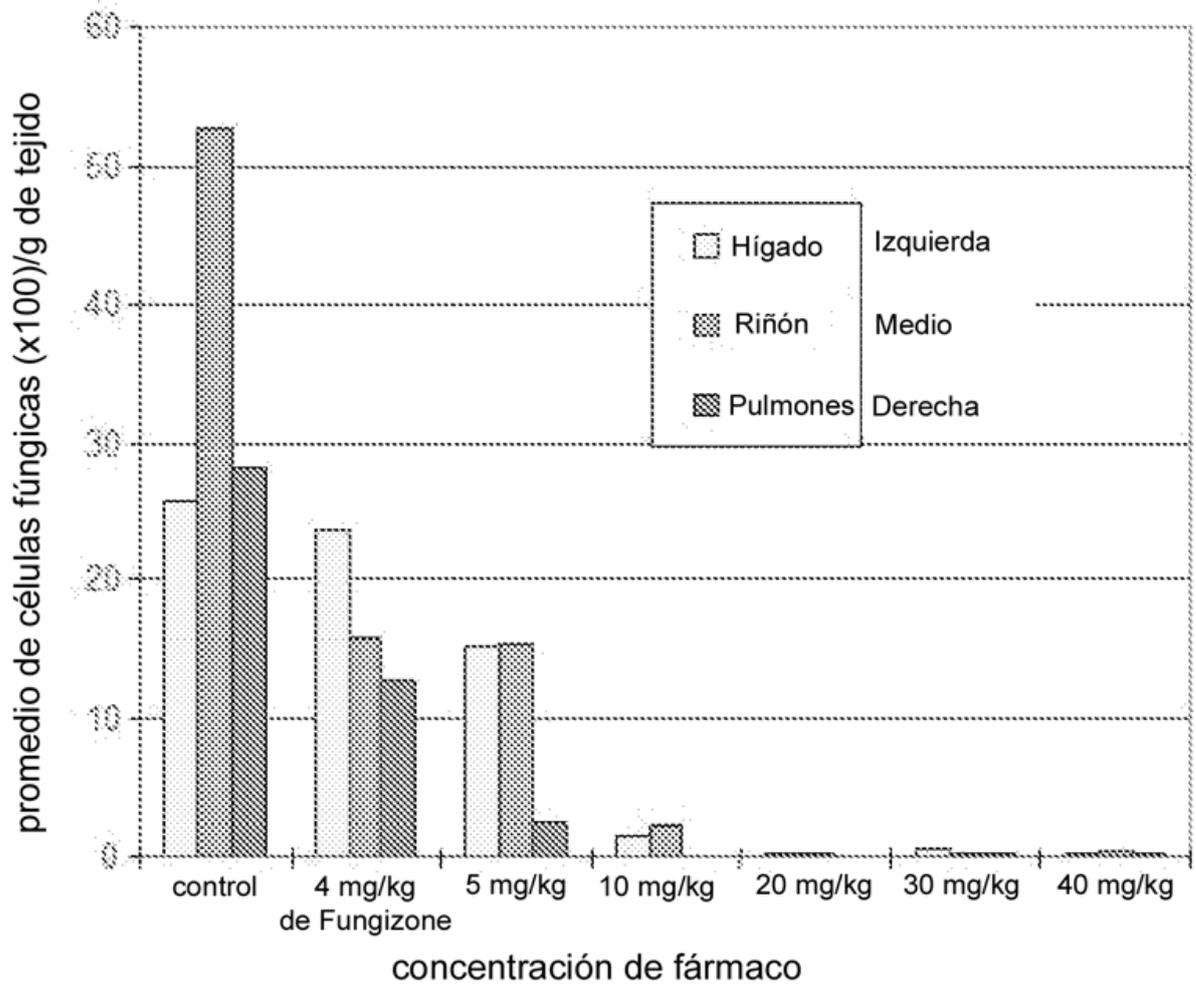


Figura 10

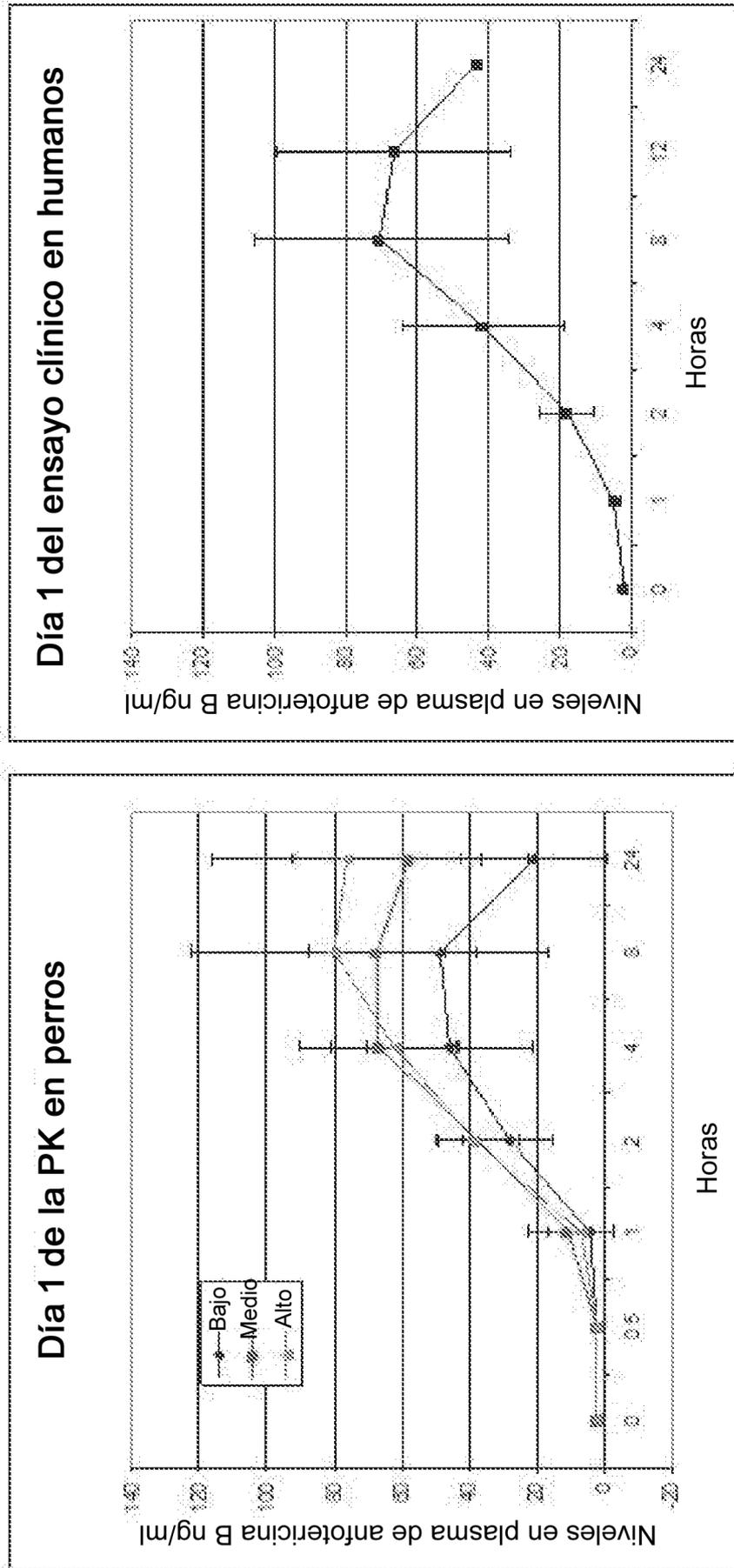


Figura 11

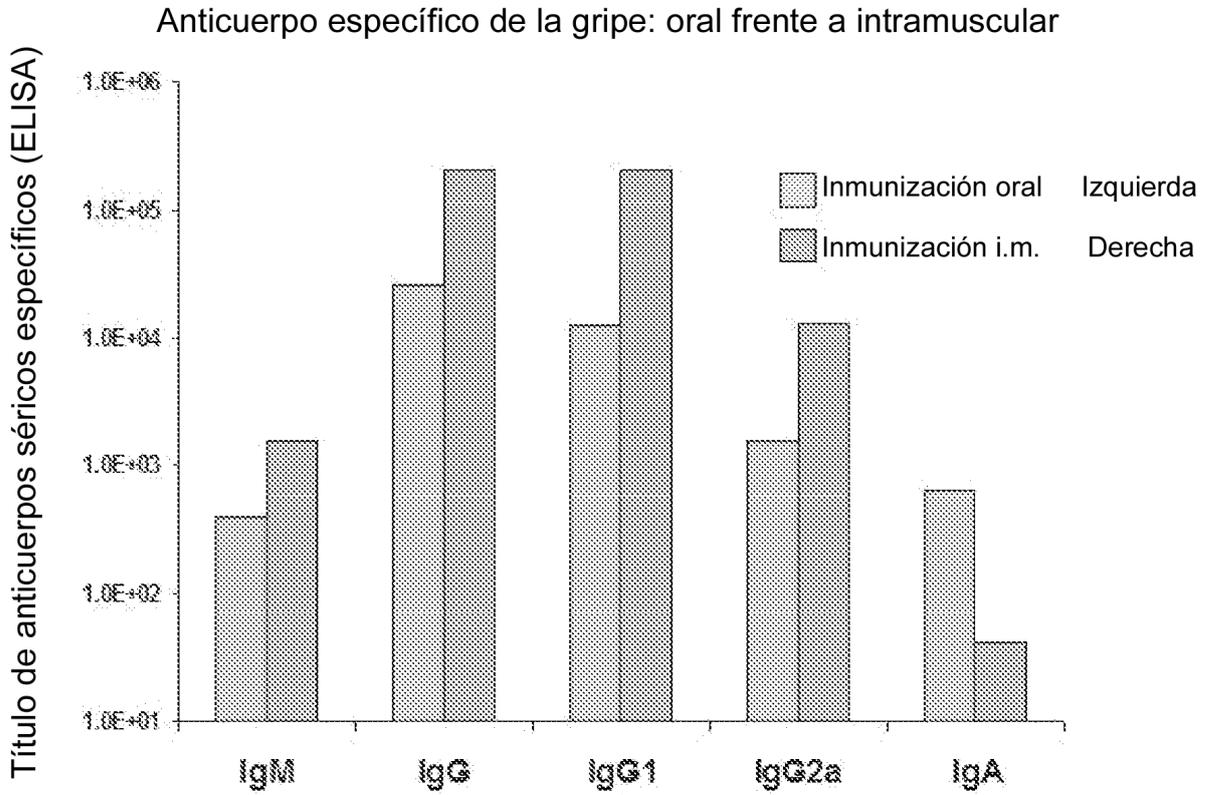


Figura 12

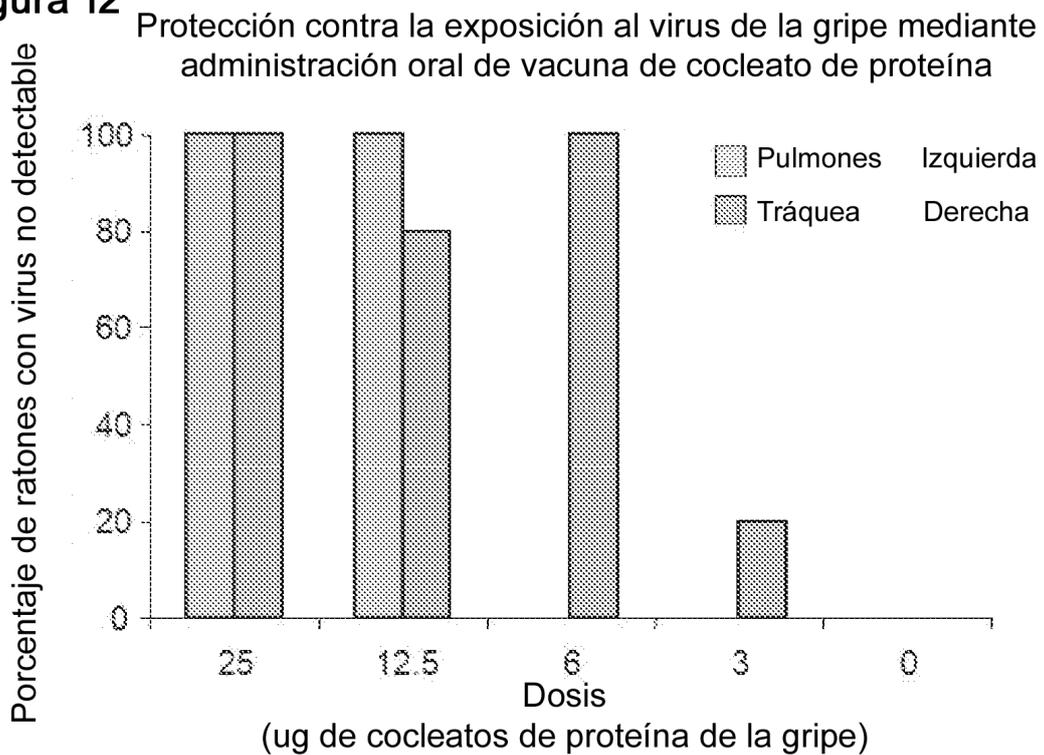
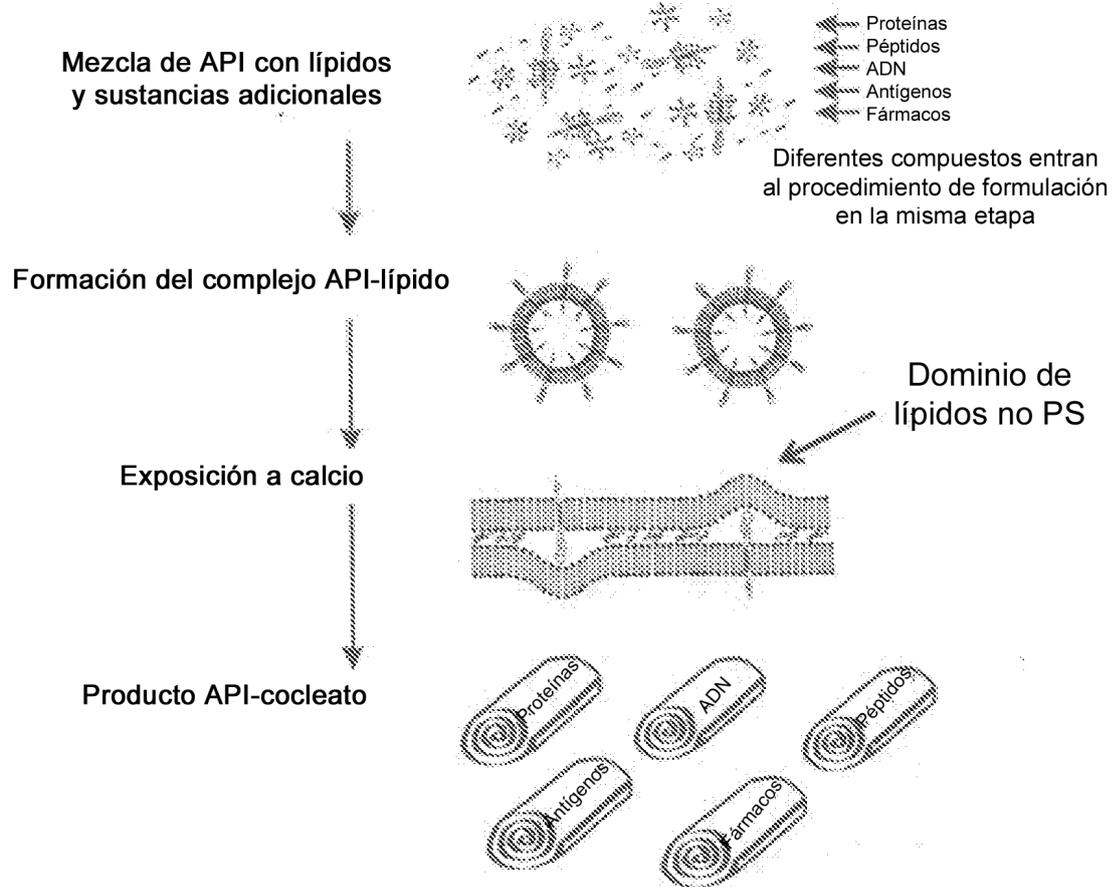


Figura 13

A



B

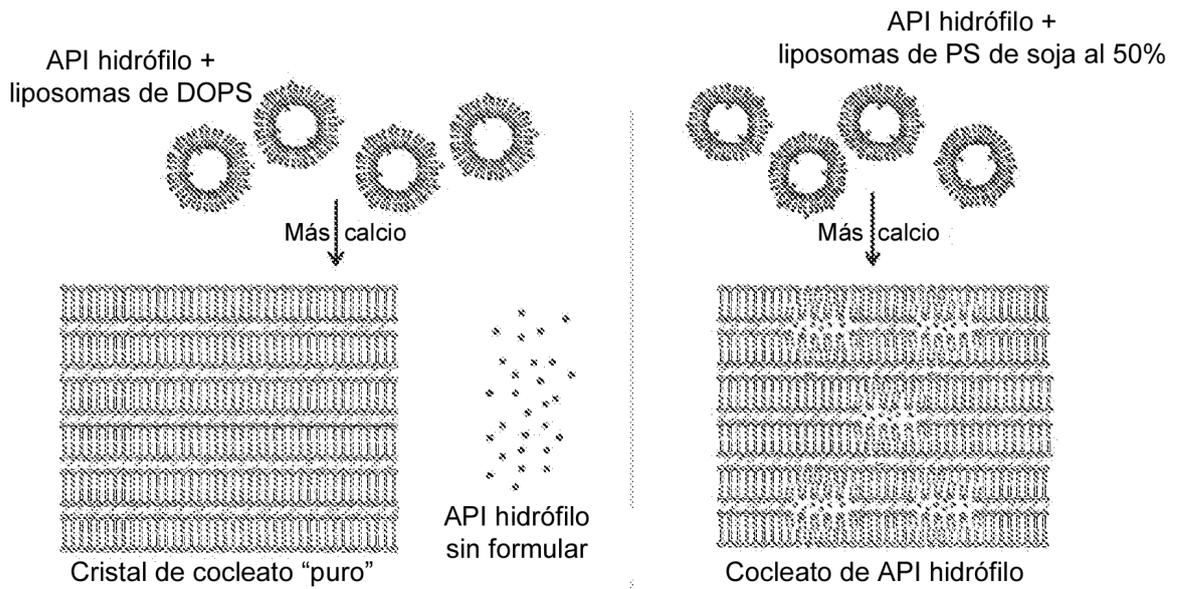


Figura 14

