

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 090**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2013 PCT/US2013/076471**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013 E 13865112 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2934303**

54 Título: **Composiciones y procedimiento para la liberación activada por la luz de materiales de nanovesículas**

30 Prioridad:

19.12.2012 US 201261739503 P

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK (50.0%)
Technology Transfer, University at Buffalo, UB Commons, 520 Lee Entrance, Suite 109
Buffalo, NY 14228-2567, US y
HEALTH RESEARCH, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOVELL, JONATHAN;
PANDEY, RAVINDRA;
CARTER, KEVIN y
SHAO, SHUAI**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 764 090 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 y procedimiento para la liberación activada por la luz de materiales de nanovesículas

- 5 La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el contrato no. R01EB017270 y DP5OD017898 concedido por el Instituto Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

- 10 La administración de fármacos a tejidos diana puede ser tan importante como el medicamento que se suministra. Se han desarrollado varios nanotransportadores clínicamente aprobados para mejorar la biodistribución y la eficacia de ciertos medicamentos. Sin embargo, dicha administración se ve obstaculizada por barreras fisiológicas y la cinética de liberación de modo que la biodistribución y la biodisponibilidad son casi inevitablemente subóptimas. En la actualidad, los enfoques más viables para la liberación de carga activada de forma externa desde
- 15 nanotransportadores comprenden sistemas que liberan su contenido cuando las temperaturas circundantes se elevan unos pocos grados por encima de la temperatura corporal mediante calentamiento directo o indirecto. Sin embargo, tales mecanismos no son fácilmente susceptibles a la modulación de liberación por inducción y la estrecha ventana de operación térmica impide una alta estabilidad del transportador a temperaturas fisiológicas.

20 CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN

Según un aspecto de la invención, se proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1. Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición para usar según la reivindicación 11.

- 25 De manera más general, la presente descripción proporciona nanopartículas autoensambladas que comprenden conjugados de porfirina-fosfolípido. Las nanovesículas que comprenden los compuestos de porfirina-fosfolípido de la presente descripción - también denominadas en este documento como nanovesículas de porfirina-fosfolípido ("PoP-NVs") o liposomas de porfirina-fosfolípido ("PoP-liposomas) proporcionan una retención de carga estable en ausencia de radiación en el infrarrojo cercano (NIR) (radiación 650-1000 nm) y la liberación controlada de la carga
- 30 después de la exposición a radiación en NIR.

- En un caso, esta descripción proporciona nanovesículas que comprenden una bicapa, comprendiendo dicha bicapa conjugados de porfirina. Los conjugados de porfirina comprenden una porfirina que tiene una cadena lateral de éter de alquilo, y un fosfolípido. En un caso, la descripción proporciona composiciones que comprenden las
- 35 nanovesículas y un portador adecuado, tal como un tampón o solución salina.

En un caso, esta descripción proporciona procedimientos para la carga de las nanovesículas con carga deseada y procedimientos para la administración de la carga in vitro o in vivo de una manera controlada espacialmente y temporalmente.

40

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1. Un monómero para bicapa de porfirina capaz de cargar una carga estable. a) Las estructuras químicas de piro-lípido y fosfolípido HPPH (pifofeórbido-a hexil éter). b) Espectros de absorción de nanovesículas aisladas
- 45 formadas a partir de cualquiera de los monómeros y cargadas con calceína. c) Retención estable de carga de bicapas de fosfolípido HPPH (también referido como lípido HPPH en esta descripción), pero no piro-lípidos. Ambos monómeros se sintetizaron y ensamblaron en nanovesículas cargadas con calceína en concentraciones de autoinactivación. Las nanovesículas se separaron de la calceína no atrapada antes de la evaluación de la fluorescencia. La emisión de fluorescencia de calceína retenida en nanovesículas se muestra antes o después de
- 50 Triton X-100 al 0,25% (Det.).

Figura 2. Ejemplo de dopaje de porfirina-fosfolípido para permeabilización mediada por luz NIR optimizada. a) Las PoP-NVs se formaron a partir de 5% de lípido PEG2K (PEG = polietilenglicol), 35% de colesterol y el 60% DSPPC. El fosfolípido HPPH se valoró en lugar de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPPC) tal como se indica, b) Porfirina-fosfolípido muestra un 99,97% de autoinactivación (comparando intactas vs alteradas con detergente).

- 55 Figura 3. Ejemplo de carga con láser de PoP-NVs. Las PoP-NVs se incubaron en una solución de calceína 2 mM y se irradió con irradiación con láser de 120 mW a 658 nm durante 3 minutos. La calceína libre y la calceína atrapada en PoP-NV se separaron con filtración en gel y se midió la relación de emisión de calceína con respecto a emisión de fosfolípido HPPH (usando los ajustes de excitación y emisión separados).

- Figura 4. Demostración de permeabilización se produce sin calentamiento de la solución en volumen. La liberación de calceína y la temperatura de la solución se midieron para PoP-NVs a) en ausencia o b) en presencia de
- 60 irradiación láser con 150 mW a 658 nm. La temperatura en la solución se midió cada 30 segundos utilizando un termopar.

- Figura 5. Demostración de estabilidad térmica conferida de PoP-NVs. Las PoP-NVs cargadas con calceína dopadas con o sin fosfolípido HPPH 10% molar se incubaron durante 10 minutos en solución salina a las temperaturas indicadas con o sin un pre-tratamiento con láser 3 minutos.
- 65

Figura 6. Demostración de que el dopaje con fosfolípido HPPH, pero no HPPH libre es suficiente para la liberación

eficaz activada por luz, a) liberación de calceína en NVs formadas con 10 por ciento molar de fosfolípido HPPH o HPPH libre e irradiadas con luz. b) Rápida redistribución en el suero de liposomas que contienen HPPH libre, pero no fosfolípido HPPH, tal como se juzga por la inactivación por fluorescencia.

- Figura 7. Ejemplo de carga remota de doxorubicina y liberación ajustable del fármaco en POP-NVs a) Filtración en gel que demuestra la carga de doxorubicina activa en PoP-NVs. Más del 95% de la doxorubicina se cargó cuando las NVs se incubaron en una relación 10:1 de lípido a fármaco a 60 °C durante 1 hora. b) Liberación del fármaco ajustable usando PoP-NVs. Las PoP-NVs cargadas con doxorubicina se cargaron y se irradiaron en tiempos y a potencias de láser variables en medios que contienen 10% de suero. La desviación estándar para 3 experimentos separados.
- 10 Figura 8. Demostración de que los caudales afectan a la liberación de carga de PoP-NVs. Las PoP-NVs cargadas con calceína se movieron a través de tubos capilares a las velocidades indicadas bajo irradiación y la liberación se midió después de la salida de fluido desde el tubo.
- Figura 9. Ejemplo de PoP-NVs cargadas con doxorubicina utilizando un gradiente de sulfato de amonio e incubadas en 10% de suero a 37 °C durante 2 días. Después de la incubación, las muestras se irradiaron con láser a 658 nm durante 5 minutos y se midió la liberación inmediatamente.
- 15 Figura 10. Ejemplo de a) densidad de fosfolípido HPPH y piro-lípido (excluyendo contribución del agua) después de simulación de MD (dinámica molecular) de 150 ns, b) Evolución de los enlaces de hidrógeno formados durante simulación MD de 500 ns. Se indican los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares para cada tipo de porfirina-lípido, c) Parámetro de orden de la cadena (SZZ) para porfirina-lípidos después de simulación MD de 500 ns. Szz indica el orden de la cadena de lípido con respecto al vector normal de bicapa.
- Figura 11. Demostración de que el dopaje con porfirina-fosfolípido permite la descarga de la carga liposomal mediada por NIR en ausencia de calentamiento en volumen o nanoescala, a) Resonancia de spin electrónico (ESR) de una muestra de PoP-liposoma que contiene 1% molar de 5-DSA como un marcador de spin, registrado a 50 °C. b) Dependencia de la temperatura de los espectros de ESR de PoP-liposomas que contienen 5-DSA. c)
- 25 Evidencia de la falta de calentamiento a nanoescala en PoP-liposomas irradiados. La anchura de pico a valle de ESR central se muestra para PoP-liposomas que contienen ácido 5-doxil estérico (5-DSA) a varias temperaturas y antes, durante y después de la irradiación que induce la permeabilización.
- Figura 12. Demostración de que el dopaje con fosfolípido HPPH produce estabilidad térmica y no intercambiable en PoP-liposomas. Se añadieron PoP-liposomas cargadas con sulforodamina B a agarosa caliente (~ 60 C) antes de verter y la solidificación. Se utilizó un láser para mediar en la liberación de carga un control espacial elevado y se denomina "UB". Cabe indicar que el colorante se distribuye por igual en todas partes de la agarosa.
- 30 Figura 13. Ejemplo de control espacial y temporal de permeabilización de PoP-liposoma a) Control espacial de la eliminación de *B. subtilis* con liberación de antibiótico activada. La gentamicina se cargó en PoP-liposomas e introdujo en agar caliente junto con las bacterias. El punto indicado se irradió con un láser de 658 nm (200 mW/cm²) durante 10 minutos y las placas se fotografiaron 24 horas más tarde. b) Control temporal de la liberación de carga en xenoinjertos PANC-1. Se obtuvieron imágenes de los ratones después de la inyección intratumoral de 5 nmol de sulforodamina B libre o sulforodamina B atrapada en concentraciones de autoinactivación en PoP-liposomas. Se muestran imágenes representativas de los puntos de tiempo y condiciones indicados. La activación por láser se realizó después de 2 horas. Los resultados representativos se muestran con n = 3 ratones por grupo de tratamiento.
- 40 Figura 14. Ejemplo de liberación ajustable bajo demanda de un fármaco activamente cargado (doxorubicina) en PoP-liposomas. a) Filtración en gel que demuestra la carga de doxorubicina activa en PoP-liposomas. Más del 95% de la doxorubicina se cargó en dox-pop-liposomas usando una relación 10:1 de lípido a fármaco a 60 °C durante 1 hora. b) Filtración en gel de los liposomas después de la irradiación láser que muestra la liberación eficaz desencadenada por la luz, c) Liberación de fármaco ajustable usando PoP-liposomas. Dox-pop-liposomas se irradiaron a tiempos y potencias de láser variables en medios que contienen 10% de suero. La liberación se evaluó a través de fluorescencia. Media +/- SD (desviación estándar) para n = 3. d) Estabilidad de dox-pop-liposomas incubadas en 10% de suero a 37 °C durante dos días y posteriormente sometidos a 4 minutos de irradiación láser de 300 mW. Media +/- SD para n = 3. e) Eliminación celular in vitro utilizando dox-pop-liposomas. Se incubaron las células Panc-1, tal como se indica, durante 24 horas con 10 µg/ml de doxorubicina tras la exposición a 200
- 50 mW/cm² de irradiación durante 10 minutos. Después de 24 horas, se reemplazó el medio y la viabilidad se evaluó 24 horas más tarde usando el ensayo de XTT. Media +/- SD para n = 8. ***Laser + dox-pop-liposomas indujo una inhibición significativa de la viabilidad celular en comparación con todos los demás grupos basados en el análisis de una vía de la varianza con test de Tukey post-hoc (P < 0,001).
- Figura 15. a) Imágenes representativas de crio-TEM de dox-pop-liposomas antes y después de la irradiación. Las flechas indican la formación de agregados de doxorubicina-sulfato dentro de los liposomas. b) Tamaño de dispersión de luz dinámica, índice de polidispersidad y potencial zeta antes y después de la liberación inducida por láser de dox-pop-liposomas c) Permeabilidad inducida temporal como se demuestra por la irradiación con láser periódica de PoP-liposomas cargadas con calceína. d) POP-liposomas vacíos se incubaron en una solución de calceína 2 mM y se irradiaron con 120 mW de irradiación láser durante 3 minutos. La calceína libre y calceína atrapada en PoP-liposomas se separaron con filtración en gel y se midió la relación de emisión de calceína con respecto a emisión de HPPH (usando los ajustes de excitación y emisión separados). Media +/- SD para n = 3.
- 60 Figura 16. Ejemplo de Dox-PoP-liposomas como una fototerapia antitumoral de un solo tratamiento administrado sistémicamente, a) Biodistribución de doxorubicina +/- tratamiento con láser. Ratones desnudos con tumores KB se inyectaron I.V. con dox-PoP-liposomas (10 mg/kg dox) y 15 minutos más tarde, el tumor se irradió con un láser de 658 nm con un índice de fluencia de 200 mW/cm² durante 12,5 minutos (150 J/cm²). Media +/- SD para n = 7-8 ratones por grupo. b) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para ratones desnudos con tumores KB. Los ratones

recibieron un solo tratamiento cuando los tumores alcanzaron 4-6 mm y se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 10 mm en cualquier dirección. Los ratones fueron tratados con dox-pop-liposomas (10 mg/kg dox) como antes, o una cantidad correspondiente de PoP-liposomas vacíos. n = 5-7 ratones por grupo.

Figura 17. Carga efectiva representativa de 10% molar de HPPH libre en liposomas. Los liposomas que contienen 50 % molar DSPC, 35 % molar de colesterol, 5 % molar de DSPE-PEG2K y 10% de HPPH libre se formaron a partir del procedimiento de película delgada, se hidrataron con solución salina tamponada, se sonicaron y se sometieron a filtración en gel. Se indican las fracciones de elución de liposomas y moléculas libres. Todas las muestras se lisaron con 0,25% de Triton-X100 antes de la medición de fluorescencia de HPPH.

Figura 18. Autoinactivación de fluorescencia representativa de PoP-liposomas que contienen 10% molar de fosfolípido HPPH o 10% molar de HPPH libre. Los liposomas se formaron con 50 % molar de DSPC, 35 % molar de colesterol, 5 % molar de DSPE-PEG2K y 10 % molar de HPPH libre o fosfolípido HPPH. Los liposomas formados con 10% de fosfolípido HPPH mostraron una inactivación de la fluorescencia de HPPH del 97% (~ 30 veces), mientras que los liposomas que contenían 10% de HPPH libre se inactivaron un 92% (~13 veces). Se midieron las muestras en PBS y se usó 0,25% de Triton-X100 para lisar los liposomas.

Figura 19. Demostración de que el fosfolípido HPPH no interfiere con la carga de anfotericina B en membranas. La anfotericina B (AMB) se cargó en los liposomas compuestos de los lípidos indicados o anfotericina B libre a través de la hidratación de película delgada de películas de 10 mg. Las muestras se sonicaron y se filtraron y la anfotericina B resultante en porcentaje de AmB soluble que podría entrar en el filtrado se evaluó a través de fluorescencia (media +/- SD para n = 3).

Figura 20. Ejemplo de vida media de PoP-liposomas en ratones después de la inyección intravenosa. Se inyectaron PoP-liposomas (compuestos de 50 % molar de DPSC, 35 % molar de colesterol, 10 % molar de fosfolípido HPPH y 5 % molar de DSPE-PEG2K) a través de la vena de la cola en ratones BALB/c (15 mg/kg basado en fosfolípido HPPH). El suero se muestreó y el fosfolípido HPPH se detectó usando fluorescencia. Se observó una vida media circulante en un solo compartimiento de 14,4 horas (SD de 1,4 horas para n = 5 ratones).

Figura 21. Ejemplo de que liberación de doxorubicina depende sólo de la fluencia total, independientemente del índice de fluencia. a) Liberación de doxorubicina de PoP-liposomas en función del tiempo. b) Tiempo necesario para la liberación de 100 % de doxorubicina a diferentes densidades de potencia.

Figura 22. Ejemplo de la liberación de la doxorubicina de PoP-liposomas en células Panc-1. Las células Panc-1 se sembraron en portaobjetos de cámara y se incubaron durante 3 horas en 10% de suero con 10 µg/ml de doxorubicina, ya sea en forma libre o PoP-liposomal antes de la obtención de imágenes confocales. El tratamiento con láser se produjo al comienzo del período de incubación (658 nm, 200 mW/cm², tratamiento de 5 minutos). Se muestra la barra de escala de 50 µm.

DESCRIPCIÓN DE LA DIVULGACIÓN

En esta descripción, se proporciona un nanosistema de liberación controlada usando nanovesículas de porfirina-fosfolípido (PoP-NVS). La liberación de la carga desde las PoP-NVs puede activarse directamente por luz del infrarrojo cercano (NIR), un estímulo clínicamente aplicable que tiene una acción insignificante en el "estado de desconexión" y una mínima interferencia con los tejidos biológicos circundantes.

La presente descripción se basa en la sorprendente observación de que una modificación estructural de compuestos de porfirina-fosfolípido proporcionó 1) una carga estable y 2) propiedades de liberación controlada a nanovesículas preparadas a partir de los compuestos. Las PoP-NVs de la presente descripción proporcionan una bicapa estable y muestran una retención de carga incluso a 90 °C. Sin embargo, se indujo una liberación rápida y controlada por exposición a radiación en NIR medio. Sorprendentemente, la liberación se produjo en ausencia de cualquier calentamiento fototérmico en solución en volumen o reacciones químicas. La permeabilidad inducida puede ser utilizada tanto para la carga como descarga de la carga y se podría modular mediante la variación del dopaje de porfirina o la intensidad y duración de la radiación láser.

En un caso, la presente descripción proporciona nanovesículas y composiciones que comprenden nanovesículas. La bicapa de las nanovesículas comprende conjugados de porfirina. El conjugado de porfirina que constituyen parte o la totalidad de la bicapa de las nanovesículas comprende porfirinas, derivados de porfirina, análogos de porfirina, o combinaciones de los mismos. Las porfirinas de ejemplo incluyen hematoporfirina, protoporfirina, y tetrafenilporfirina. Los derivados de porfirina de ejemplo incluyen pirofeoforbides, bacterioclorofilas, clorofila A, derivados de benzoporfirina, tetrahidroxifenil clorinas, purpurinas, benzoclorinas, naftoclorinas, verdinas, rodinas, ceto clorinas, azaclorinas, bacterioclorinas, toliporfirinas y benzobacterioclorinas. Los análogos de porfirina de ejemplo incluyen miembros de la familia de porfirina expandida (tales como texafirinas, sapfirinas y hexafirinas) e isómeros de porfirina (tales como porfícenos, porfirinas invertidas, ftalocianinas y naftalocianinas).

En ciertos casos de la descripción, el conjugado de porfirina comprende un metal quelado en el mismo, preferiblemente un metal divalente, tal como Zn, Cu, Ni, Co, Pd o Mn, y, opcionalmente, un radioisótopo de un metal, tal como Cu-64.

Como se usa en este documento, "fosfolípidos" es un lípido que tiene un grupo de cabeza hidrófilo que tiene un grupo fosfato conectado a través de un esqueleto de glicerol a una cola lipídica hidrófoba. El fosfolípido comprende una cadena lateral de acilo de 6 a 22 carbonos, incluyendo todos los números enteros de átomos de carbono y los

intervalos entre ellos. En ciertos casos, el fosfolípido en el conjugado de porfirina es 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina.

El fosfolípido en el conjugado de porfirina puede comprender, o consistir esencialmente en fosfatidilcolina, 5 fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o fosfatidilinositol.

En un caso, la porfirina en el conjugado de porfirina es pirofeoforbido-a hexil éter (HPPH).

En ciertos casos, la porfirina se conjuga con el grupo glicerol en el fosfolípido mediante un enlazador de cadena de 10 carbonos de 1 a 20 carbonos, incluyendo todo los números enteros de átomos de carbono entre los mismos.

Sin pretender estar ligado por ninguna teoría particular, se considera que la cadena lateral de éter del conjugado de porfirina proporciona a la nanovesícula una densidad de bicapa mejorada. La cadena lateral de éter de alquilo puede 15 contener de 2 a 20 carbonos, incluyendo todos los número enteros de átomos de carbono e intervalos entre los mismos. La porción de alquilo de la cadena lateral de éter puede ser lineal o ramificada.

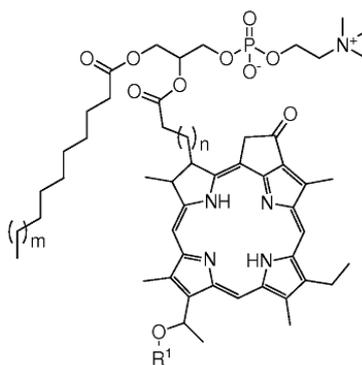
En ciertos casos, la bicapa de la nanovesícula autoensamblada comprende además PEG o PEG-lípido. El PEG o PEG-lípido puede ser DSPE-PEG, tal como DSPE-PEG-2000, DSPE-PEG-5000 u otros tamaños de DSPE-PEG. El PEG-lípido está presente en una cantidad de 0-15% molar, incluyendo todos los números enteros entre ellos. En 20 ciertos casos es de 1 a 15% molar, 2 a 10% molar, 4 a 6% molar. En un caso, es 5% molar.

En varios casos, además de los conjugados de porfirina descritos en este documento, la bicapa de las nanovesículas comprende también otros fosfolípidos. Las cadenas de ácido graso de estos fosfolípidos pueden 25 contener un número adecuado de átomos de carbono para formar la bicapa. Por ejemplo, la cadena de ácido graso puede contener 12, 14, 16, 18 o 20 átomos de carbono. En diferentes casos, la bicapa puede comprender fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o fosfatidilinositol.

En varios casos, las nanovesículas pueden incluir lípidos o fosfolípidos modificados covalentemente con polietilenglicol (PEG). Este PEG-lípido puede estar presente de 0,1 a 20% molar y todos los valores hasta el decimal 30 en decimal lugar entre los mismos y los intervalos entre los mismos en las nanovesículas. El peso molecular promedio del resto de PEG puede ser de entre 500 y 5000 Daltons y todos los valores enteros e intervalos entre los mismos.

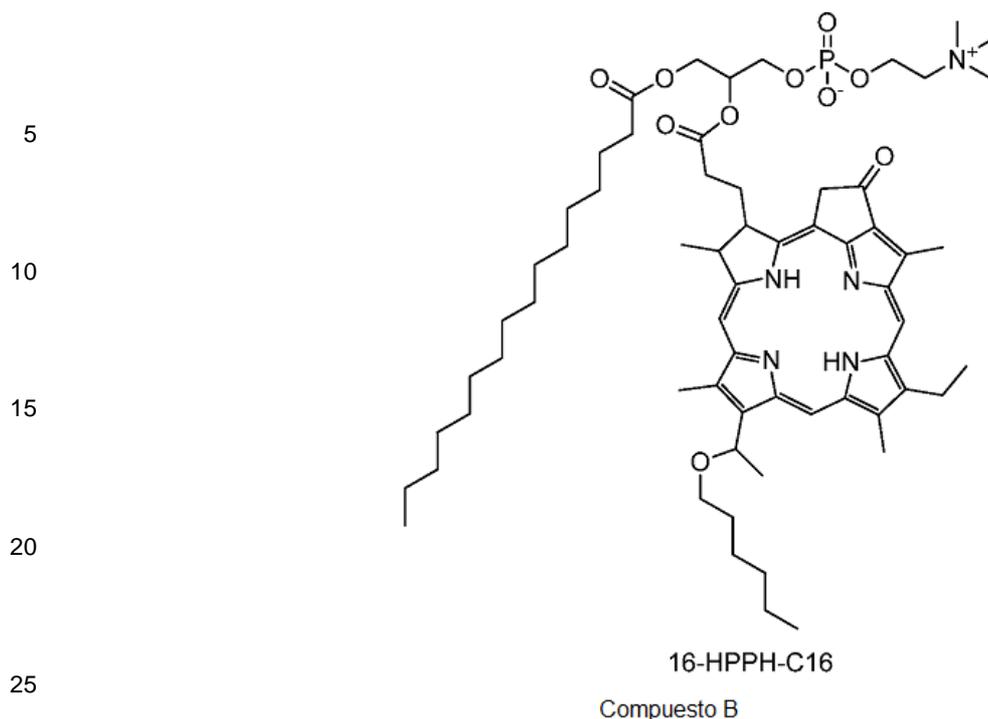
En un caso, las nanovesículas están libres de colesterol. En otros casos, el colesterol puede ser de 0,1 a 60% molar 35 y todos los valores hasta el decimal en decimal lugar entre los mismos y los intervalos entre los mismos. En un ejemplo, el colesterol está en la bicapa. El uso del monómero PoP-NV de la presente descripción activó la carga eficaz de la carga en nanovesículas libres de suero y de colesterol y el uso de NIR medio dieron lugar a una rápida y hasta un 100% de liberación de la carga.

40 La presente descripción proporciona un conjugado de porfirina y fosfolípido que tiene la estructura siguiente:



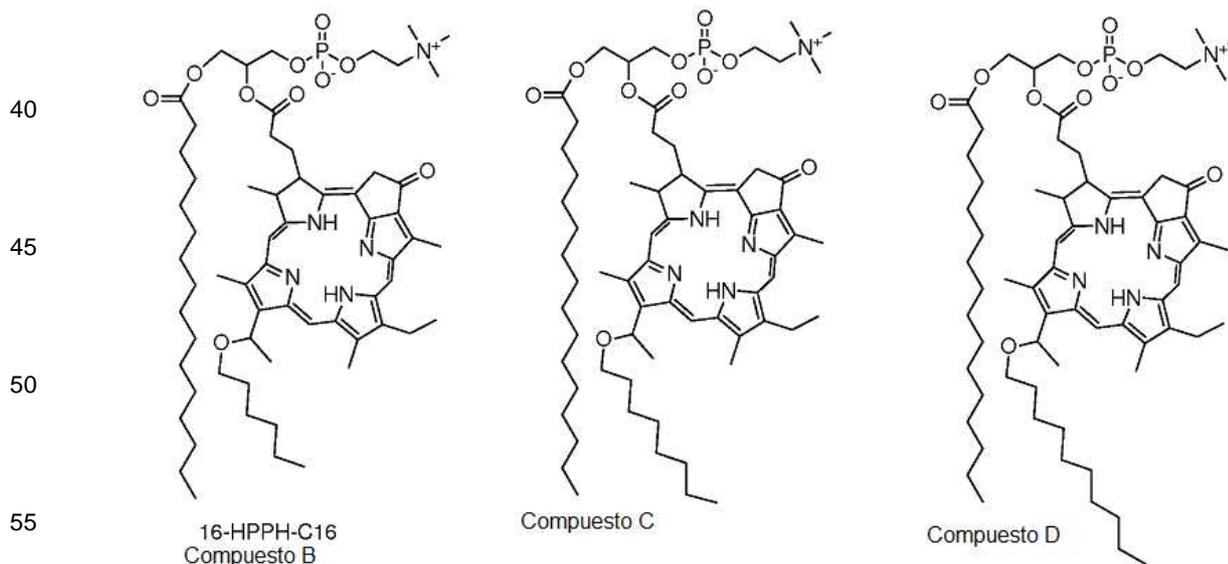
Este compuesto es referido en el presente documento como compuesto A, en donde m es un número entero de 1 a 12, n es un número entero de 1 a 12, y R¹ es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene 60 de 2 a 20 átomos de carbono. En una realización, R¹ no es un átomo de hidrógeno.

En un caso, la presente descripción proporciona un conjugado de porfirina que tiene la siguiente estructura - denominada en este documento como PC-HPPH-C16 o Compuesto B (también denominado en este documento 65 como 16-HPPH-C16).



En un caso, la nanovesícula comprende una bicapa que comprende un conjugado de porfirina que comprende una porfirina y un fosfolípido, la porfirina que tiene una cadena lateral de éter de alquilo. En un caso, la nanovesícula
30 comprende una bicapa que comprende un conjugado de porfirina que tiene la estructura del Compuesto A. En otro ejemplo, se proporciona una nanovesícula que comprende una bicapa que comprende un conjugado de porfirina que tiene la estructura de PC-HPPH-C16.

En varios casos, la presente descripción proporciona un conjugado de porfirina que tiene una de las siguientes
35 estructuras:



La bicapa de la nanovesícula de la presente descripción puede comprender de 1 a 100 % molar de los compuestos
60 conjugados de porfirina y fosfolípidos de la presente descripción. En varios casos, la bicapa de la nanovesícula se compone de al menos 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95 % molar (y todos los números enteros entre los mismos) de conjugado de porfirina y fosfolípido. En contraste con el requisito de al menos 15 % molar descrito en la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2012/0253191, se observó inesperadamente que el % molar de los compuestos conjugados de porfirina y fosfolípido de la presente descripción podría ser de menos del 15% para
65 conseguir una liberación eficaz activada por la luz. Por lo tanto, en un caso, la bicapa de PoP-NV se compone de menos del 15 % molar de conjugado de porfirina y fosfolípido. En otro caso, la bicapa de nanovesícula comprende

- de 0,1 a 14,4 % molar, de 5 a 14 % molar, de conjugado de porfirina y fosfolípido y todos los valores hasta el 0,1 % molar y los intervalos entre los mismos. En otros casos, la bicapa de la nanovesícula comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 % molar del conjugado de porfirina y fosfolípido. En un caso, la bicapa de la nanovesícula comprende del 9,5 a 10,5 % molar de conjugado de porfirina y fosfolípido. El nivel de dopaje debe ser tal como para
- 5 conferir una liberación activada por la luz de la carga cargada. En otro caso, la bicapa de PoP-NV se compone de más de 15 % molar de conjugado de porfirina y fosfolípido, o entre 15-100% de conjugado de porfirina y fosfolípido, siempre que el monómero de porfirina-fosfolípido confiera una carga estable de la carga en ausencia de radiación en NIR y la liberación de la carga después de la exposición a NIR.
- 10 Las nanovesículas son sustancialmente esféricas y tienen un tamaño de desde 30 nm a 250 nm de diámetro y todos los números enteros hasta el nm e intervalos entre los mismos. En un caso, el tamaño de las nanovesículas es de 100-175 nm. En un caso, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, o 100% de las nanovesículas en la composición tienen un tamaño de 30 a 250 nm o de 100 a 175 nm.
- 15 En un caso, la descripción proporciona una composición que comprende nanovesículas de la presente descripción y un portador estéril adecuado para la administración a individuos, incluyendo los seres humanos - tal como un tampón fisiológico, tal como sacarosa, dextrosa, solución salina, elemento de tamponamiento del pH (tal como de pH 5 a 9, de pH 7 a 8, de pH 7,2 a 7,6, (por ejemplo, 7,4) elemento), tal como histidina, citrato, o fosfato. En un caso, la composición comprende al menos 0,1% (p/v) de PoP-NVs de la presente descripción. En varios casos, la
- 20 composición comprende de 0,1 a 100% de PoP-NVs. En un caso, una parte de la molécula agente (carga) puede estar incrustada en la bicapa. Un ejemplo de carga hidrófoba cargada en la bicapa es anfotericina B.
- Se puede cargar una amplia variedad de carga en las nanovesículas de la presente descripción y se liberan en los lugares deseados utilizando luz del infrarrojo cercano. Por ejemplo, los agentes bioactivos o terapéuticos, sustancias
- 25 farmacéuticas o medicamentos se pueden encapsular dentro del interior de las PoP-NV. Estos incluyen fármacos solubles en agua y también fármacos que son ácidos o bases débiles que se pueden cargar a través de gradientes químicos y se concentran en el núcleo acuoso de la nanovesícula. Por lo tanto, en varios casos, la nanovesícula comprende un agente activo encapsulado en la misma, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico, que puede ser un agente de quimioterapia, tal como doxorubicina. El agente quimioterapéutico doxorubicina se
- 30 podría cargar de manera activa y liberar con radiación en NIR proporcionando una liberación robusta y activada por la luz directa usando nanovesículas de PoP.
- En un caso, la relación de lípido a fármaco (o cualquier otro agente de carga) es de 10:1 a 5:1. En varios casos, la
- 35 relación de lípido a fármaco/carga a es de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1 o 5:1.
- El término "agente terapéutico" es reconocido en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que sea una sustancia biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activa. Ejemplos de agentes terapéuticos, también
- 40 referidos como "fármacos", se describen en referencias de la bibliografía bien conocidas, tales como el Índice Merck, el Physicians Desk Reference, y The Pharmacological Basis of Therapeutics, y que incluyen, sin limitación, medicamentos; vitaminas; suplementos minerales; sustancias utilizadas para el tratamiento, prevención, diagnóstico, curación o mitigación de una enfermedad o malestar; sustancias que afectan a la estructura o función del cuerpo; o profármacos, que se vuelven biológicamente activos o más activos después de situarse en un entorno fisiológico. Pueden usarse varias formas de un agente terapéutico que son capaces de liberarse de la composición
- 45 en cuestión a los tejidos o fluidos adyacentes tras la administración a un sujeto. Los fármacos que se conoce que cargan a través de gradientes activos incluyen doxorubicina, daunorrubicina, gemcitabina, epirubicina, topotecan, vincristina, mitoxantrona, ciprofloxacina y cisplatino. La carga terapéutica también incluye diversos antibióticos (tales como gentamicina) u otros agentes eficaces contra infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos u otros organismos. Estos fármacos se pueden cargar y liberar en PoP-NVs.
- 50 Un "diagnóstico" o "agente de diagnóstico" es cualquier resto químico que puede ser utilizado para el diagnóstico. Por ejemplo, agentes de diagnóstico incluyen agentes de formación de imágenes, tales como los que contienen radioisótopos, tales como indio o tecnecio; agentes de contraste que contienen yodo o gadolinio; enzimas, tales como la peroxidasa de rábano picante, GFP, fosfatasa alcalina, o beta-galactosidasa; sustancias fluorescentes, tales como derivados de europio; sustancias luminiscentes, tales como derivados de N-metilacridio o similares.
- 55 En ciertos casos, las nanovesícula comprende además moléculas de reconocimiento, tales como un anticuerpo, péptido, aptámero o ácido fólico. "Molécula diana" es cualquier molécula que puede dirigir la nanovesícula a una diana particular, por ejemplo, mediante la unión a un receptor u otra molécula en la superficie de una célula diana. Las moléculas de reconocimiento pueden ser proteínas, péptidos, moléculas de ácidos nucleicos, sacáridos o
- 60 polisacáridos, ligandos de receptores u otras moléculas pequeñas. El grado de especificidad puede modularse a través de la selección de la molécula de reconocimiento. Por ejemplo, los anticuerpos típicamente presentan una alta especificidad. Estos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos, recombinantes, o de una sola cadena, muchos de los cuales están disponibles comercialmente o se obtienen fácilmente usando técnicas estándar.
- 65 En un caso, la descripción proporciona un procedimiento para preparar un nanovesícula que comprende mezclar un conjugado de porfirina-fosfolípido en tampón, en el que los conjugados de porfirina-fosfolípido son como se

describen en el presente documento, y extruir la mezcla para producir una nanovesícula en bicapa de porfirina-fosfolípido que comprende una bicapa de la cantidad deseada del conjugado de porfirina-fosfolípido. Además de la porfirina-fosfolípido, otros fosfolípidos o lípidos pueden incluirse en la mezcla para formar las PoP-NVs. Por ejemplo, en un caso, se pueden utilizar DSPE-PEG-2K (por ejemplo, 5% en moles); colesterol (por ejemplo, 35% en moles) y lípidos (por ejemplo, DSPC 50% en moles). El conjugado porfirina-fosfolípido se puede preparar por esterificación de un tetrapirrol que contiene un ácido carboxílico a un liso-fosfolípido. Por ejemplo, HPPH puede esterificarse a temperatura ambiente con 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (liso-C16-PC), Avanti # 855675P) utilizando EDC y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, Disher # AC14827 -0250) en cloroformo en una relación molar 1:1:2:2 de liso-C16-PC:HPPH:EDC:DMAP.

10

En un caso, las PoP-NVs se forman por dispersión de porfirina-lípido, PEG-lípido, colesterol y otros componentes de lípidos en cloroformo y a continuación evaporación del disolvente. La película de lípido se hidrata con un tampón (tal como tampón fosfato salino (PBS)) y a continuación, después de ciclos de congelación y descongelación, las PoP-NVs se extruyen a través de una membrana de filtro (tal como una membrana de policarbonato de 100 nm) múltiples veces. Alternativamente, o adicionalmente, también se puede utilizar la extrusora de lípidos a alta presión. Para PoP-NVs cargadas con fluoróforo, la solución hidratante es típicamente calceína (100 mM). La calceína libre se puede eliminar mediante filtración en gel (tal como con una columna Sephadex PD-10). Para la carga del fármaco activo, como ejemplo, se puede utilizar una solución de hidratación de sulfato de amonio 125 mM, pH 5,5. El sulfato de amonio libre se puede eliminar mediante filtración en gel o diálisis y el agente activo puede cargarse activamente en las pop-NVs utilizando, por ejemplo, una proporción de 10:1 de fármaco:lípido. La eficacia de carga y el atrapamiento de calceína y agentes activos pueden evaluarse mediante el examen de las fracciones de filtración en gel incluidas y excluidas. Alternativamente, para cierta carga, la carga puede monitorizarse usando un lector de fluorescencia comparando la fluorescencia de la muestra de PoP-NV con las PoP-NVs cargadas inicialmente, así como las PoP-NVs permeabilizadas con detergente Triton X-100 (tal como 0,5%). La calceína y el agente activo (tal como doxorubicina) pueden ser detectados mediante longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas. Por ejemplo, se pueden utilizar excitación a 485 nm y emisión a 525 nm para la calceína y se pueden utilizar excitación a 480 nm y emisión a 590 nm para detectar agente activo, tal como doxorubicina. El estado de auto-ensamblaje de PoP-NV y la posición de elución pueden también rastrearse sin interferencia utilizando excitación a 420 nm y emisión a 670 nm para las porfirinas.

30

En un caso, la descripción proporciona un procedimiento de suministro de agentes contenidos como carga en las nanovesículas a los puntos deseados. Aunque, a veces, la carga se describe como fármaco en la descripción, la descripción es igualmente aplicable a cualquier agente contenido para el tratamiento y/o suministro a un lugar deseado, y el término "fármaco" pretende referirse a cualquier agente. El agente puede estar contenido, en su totalidad o en parte, dentro de o en las PoP-NVs, ya sea presente en el compartimiento acuoso, la bicapa o ambos. Por lo tanto, en otro aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el suministro de la carga de una nanovesícula que comprende las etapas de: 1) proporcionar una composición que comprende nanovesículas de la presente descripción que comprende la carga (tal como un agente activo); 2) permitir que las nanovesículas alcancen un destino seleccionado o deseado; 3) irradiar la nanovesícula con radiación que tiene una longitud de onda de infrarrojo cercano en condiciones, tales que al menos una parte de la carga se libera de la nanovesícula.

40

El procedimiento de la presente descripción se puede llevar a cabo in vitro o in vivo. Cuando se lleva a cabo in vivo, en un caso, la irradiación con radiación de infrarrojo cercano es tal que la temperatura del tejido circundante no aumenta más de 10 grados Celsius. En varios casos, la temperatura del tejido circundante no aumenta más de 5, 6, 7, 8, 9 y 10, 11 y 12 grados Celsius. En otros casos, la temperatura del tejido circundante aumenta menos de 5 grados Celsius. El procedimiento de la presente descripción se puede utilizar en cualquier individuo de cualquier edad, incluyendo animales y seres humanos.

45

Las nanovesículas se irradian con luz del infrarrojo cercano de un láser de potencia de 50 a 1.000 mW/cm², incluyendo todos los valores enteros a mW/cm² y oscila entre los mismos, en una longitud de onda de 650 a 1000 nm, incluyendo todos los valores enteros al nm y oscila entre los mismos. En otro caso, la longitud de onda es de 650 a 800 nm, incluyendo todos los valores enteros al nm y todos los intervalos entre los mismos.

50

El grado de liberación de la carga depende también del tiempo de exposición. En general, un tiempo de hasta 30 minutos o menos es suficiente. En varios casos, las nanovesículas in vitro o in vivo pueden irradiarse de 0,5 a 30 minutos y todos los valores hasta el decimal en décimo lugar entre los mismos. En un caso, las nanovesículas se irradian con un diodo láser de 658 nm durante un máximo de 10 minutos. En otros casos, las nanovesículas se irradian con longitudes de onda de 665 o 671 nm. Mediante la variación de la potencia del láser y/o el tiempo de láser, se consigue el control sobre la cantidad de fármaco que se libera desde las PoP-NVs. Además, la irradiación controlada para lograr una estrategia de liberación ligera "sólo de vasos pequeños" puede dar lugar a una liberación de fármaco sistémica más baja y no dañará los vasos críticos en órganos con amplia vasculatura (tal como el páncreas).

60

La radiación infrarroja puede suministrarse a la zona deseada directamente mediante la iluminación con luz láser en el área o se pueden usar sondas de fibra óptica. En el caso de un tumor, la sonda de fibra óptica puede ser insertada en el tumor (es decir, a través de un catéter o dispositivo endoscópico) para proporcionar la irradiación en un área localizada. Después de la exposición al láser, las nanovesículas se pueden resellar. De esta manera, la

65

apertura y el cierre de las nanovesículas es reversible. El resellado permite nuevas aplicaciones, tales como la captura del contenido de la vasculatura del tumor que contiene pequeñas moléculas específicas de tumor y moléculas más grandes, tal como las proteínas. Esto podría permitir el análisis aguas abajo de contenido tumoral. Además, el resellado evita la agregación, por lo que los liposomas pueden depositar eficazmente su
 5 carga. Además, la recuperación de nanovesículas reselladas mediante extracción de sangre o biopsia podría realizarse para evaluar el progreso del tratamiento.

Una propiedad útil de las nanovesículas de la presente descripción es que hay una liberación mínima (es decir, menos del 1% de liberación del contenido por hora) del agente activo hasta que la luz del infrarrojo cercano se
 10 ilumina en la nanovesícula. En un caso, el 100% del agente activo (carga) que se irradia en el tejido diana con la potencia del láser suficiente se libera de la nanovesícula. Cuando el agente activo se libera in vivo de la nanovesícula, la temperatura del tejido circundante no aumenta significativamente. Mediante la selección de la intensidad de la NIR aplicada, puede controlarse la cantidad de carga liberada en un lugar determinado o un tiempo determinado. Por lo tanto, cualquiera entre 1 a 100% (y todos los números enteros entre los mismos) de la carga de
 15 las nanovesículas pueden liberarse en lugares y tiempos deseados. En un caso, la liberación de la carga (cualquiera entre 1 y 100% de la carga) se consigue en una o más etapas. Por ejemplo, los pulsos de la exposición a NIR se pueden usar a intervalos de tiempo deseados de modo que la carga se libera en etapas.

La composición que comprende las nanovesículas en un portador adecuado puede administrarse a los individuos
 20 mediante cualquier vía adecuada. En un caso, se administra por infusión intravenosa, de manera que entrará en la vasculatura (sistema circulatorio). La composición se puede administrar sistémicamente o se puede administrar directamente en el suministro de sangre para un órgano o tejido particular o tumor. Cuando se irradia mediante NIR, el contenido de las PoP-NVs puede liberarse dentro del sistema circulatorio y a continuación puede entrar en el tejido circundante. En ciertos casos, las PoP-NVs pueden proporcionarse directamente al tejido pertinente.

25 Una ventaja de las PoP-NVs es que funcionan a través del calentamiento a nanoescala, en lugar de calentamiento en volumen. El calentamiento a nanoescala permite la liberación efectiva desde las PoP-NVs sin calentamiento significativo del tejido circundante. Por lo tanto, en un ejemplo, se logró la liberación rápida de la totalidad de la carga en tres minutos tras irradiación con láser de NIR (0,1 W). Estas mismas PoP-NVs mostraron una liberación mínima
 30 durante 30 minutos a 45 °C (una temperatura más alta de lo que se requiere para los liposomas sensibles a la temperatura (TS-liposomas) para liberar rápidamente su contenido completo) y ni siquiera liberan completamente toda su carga cuando se calientan a la temperatura extrema de 95 °C durante 30 minutos. Por lo tanto, las PoP-NVs son únicas porque demuestran una liberación inducida por la luz extremadamente eficaz, sin embargo, son excepcionalmente estables a temperaturas elevadas. Al menos estos dos atributos se combinan para formar la base
 35 de un mecanismo de liberación de fármacos activados con precisión.

Además, la estabilidad en suero de las PoP-NVs permite opciones de puntos de tiempo más largos para la liberación desencadenada (deben desencadenarse menos sistemas de suministro estable inmediatamente después de la administración).

40 En un caso, la presente descripción proporciona una nanovesícula que comprende una bicapa de al menos 1 % molar, del 1 al 14 % molar, del 7 al 13 % molar, del 8 al 12 % molar, del 9 al 11 % molar, o del 9,5 al 10,5 % molar de conjugado de porfirina y fosfolípido, donde el conjugado de porfirina y fosfolípido tiene la estructura del Compuesto A. En otro caso, la presente descripción proporciona una nanovesícula que comprende una bicapa de al menos 1 %
 45 molar, del 1 al 14 % molar, del 7 al 13 % molar, del 8 al 12 % molar, del 9 al 11 % molar, o del 9,5 al 10,5 molar de conjugado de porfirina y fosfolípido, donde el conjugado de porfirina y fosfolípido tiene la estructura de PC-HPPH-C16 (Compuesto B), Compuesto C o el Compuesto D. En un caso, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden las nanovesículas en un portador adecuado. En otro caso, la presente descripción proporciona un procedimiento para suministrar un agente a un sitio deseado, que comprende las etapas de: cargar
 50 el agente como un carga en las PoP-NVs de la presente descripción, administrar las PoP-NVs a un individuo, provocar la liberación de la carga (agente) en los sitios deseados mediante la iluminación de radiación de infrarrojo cercano a medida que las nanovesículas pasan a través de la vasculatura en el sitio deseado, de manera que se libera la carga desde las nanovesículas. En un caso, tras iluminar con la radiación NIR, la liberación de la carga (agente) se alcanza cuando las nanovesículas se mueven a través de vasos sanguíneos pequeños (tales como capilares). En un caso, tras la iluminación con radiación NIR, la carga se libera cuando el flujo de sangre es de 0,5 a
 55 10 mm/s. De esta manera, la liberación del fármaco puede limitarse solamente a vasos más pequeños en los tejidos diana y no cerca de los vasos sanguíneos más grandes.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente descripción. No pretenden limitarla en forma alguna.

60 EJEMPLO 1

Este ejemplo describe la síntesis de PoP-NVs, y la carga y la liberación de la carga

65 Procedimientos

Síntesis de PoP-NVs: En este ejemplo, se utilizó un pirofeofórbido-a hexil éter (HPPH)-lípidos como un agente dopante de PoP-NV estable. El fosfolípido HPPH se sintetizó usando HPPH disponible comercialmente y esterificando 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolcolina (liso-C16-PC, Avanti # 855675P) utilizando EDC y 4-dimetilaminopiridina (DMAP; Fisher # AC14827- 0250) en cloroformo a una relación molar 1:1:2:2 Lyco-C16-PC: HPPH:DMAP:EDC. El fosfolípido HPPH resultante se purificó con gel de dióxido de silicio y se liofilizó en una solución de 80% de t-butanol (Sigma, # 360538) y 20% de agua. Se confirmó la pureza con CCF (> 90% de pureza) y la identidad se confirmó con espectrometría de masas. Para generar PoP-NVs, se creó una solución de 0,5-2 mg que comprendía los lípidos en cloroformo, se evaporó, se rehidrató con solución salina tamponada con fosfato, se sometió a 5 ciclos de congelación-descongelación y se sonicó durante 10 minutos. En el caso de la extrusión, la solución se sometió a 11 pases a través de una membrana de policarbonato de 100 nm.

Carga de la carga y liberación de PoP-NVs: La carga de calceína se logró mediante la hidratación de PoP-NVs con una solución 100 mM de calceína (Sigma # 21030) y la posterior separación en filtración en gel sobre una columna Sephadex G-75 (VWR # 95016- 784). La carga de doxorubicina se logró mediante la extrusión de una película lipídica con una extrusora de lípidos de alta presión (Lipex) con una solución de sulfato de amonio 150 mM. El sulfato de amonio libre se extrajo usando una columna de Sephadex G-75 y se cargó doxorubicina (LCLabs # D-4000) mediante la adición de una proporción 1:10 de fármaco:lípido y la incubación a 60 °C durante 1 hora. La doxorubicina libre se extrajo usando una columna de Sephadex G-75. Para los experimentos de liberación, las soluciones de PoP-NV de 0,5-2 mg/ml se diluyeron generalmente en un factor de 50-100 para los experimentos de calceína, y 10-20 veces para la liberación de doxorubicina, a un punto en el que la luz podía pasar libremente a través de la solución. Los experimentos de liberación se realizaron utilizando un diodo láser manual de 120 mW o un diodo láser ajustable a 658 nm de 500 mW (LaserGlow). Las irradiaciones se realizaron como se indica. La temperatura se midió mediante la inserción de una sonda de termopar de tipo K directamente en la solución irradiada. La liberación de calceína se evaluó midiendo la liberación antes y después del tratamiento, incluyendo la solubilización con 0,1% de Triton X-100. La liberación se calculó utilizando la fórmula Liberación = (Ffinal-Finic)/(FTX100-Finic) * 100%. La liberación de carga usando diferentes velocidades de flujo se realizó usando una bomba de jeringa.

Resultados

La estructura del monómero pirofeofórbido-C16-fosfatidilcolina y HPPH-C16-PC se muestran en la **Figura 1a**. HPPH está relacionado con la estructura piro, pero parece generar un mayor equilibrio entre cadenas laterales y también es un agente terapéutico de porfirina clínicamente aprobado. Se sintetizó HPPH-C16-PC y se examinó el comportamiento de nanovesículas formadas a partir de 95% de monómero de porfirina junto con 5% de PEG-lípido. Tal como se muestra en la **figura 1b**, cuando se carga con calceína, un pico de calceína claro era evidente en los espectros de absorción de NVs de fosfolípido HPPH aisladas (también referido como porfisomas), pero no las formadas a partir Piro-fosfolípido (referido como piro-porfisomas). La Figura 1c demuestra que la calceína mantiene la concentración de autoinactivación en las NVs de HPPH, pero no fue detectable la calceína retenida en piro-NVs.

A continuación, se cómo una irradiación NIR suave (3 min, 120 mW usando un láser de 658 nm) afectaría a la eficacia de atrapamiento de liposomas, a medida que se incorporaban cantidades crecientes de monómero fosfolípido HPPH. Se utilizó un punto de partida de 5% de PEG-lípido, 35% de colesterol y 60% de DSPC, que es similar a la formulación LipoDox comercial estable, y se sustituyó de forma incremental DSPC por fosfolípido HPPH. Sin dopaje de fosfolípido HPPH, las NVs permanecieron totalmente cargadas después de la irradiación con NIR. Sin embargo, cuando sólo se incluyó 10 % molar de fosfolípido HPPH en las PoP-NVs, se observó la liberación completa de la carga después de la irradiación (**Figura 2a**). Inesperadamente, a medida que se titulaba una porción mayor de fosfolípido HPPH en las PoP-NVs, disminuía continuamente la cantidad de permeabilización inducida por la luz, a pesar del carácter óptico superior de la bicapa y la mayor absorción de luz de las NVs. A un 10% de fosfolípido HPPH, las PoP-NVs estaban esencialmente completamente autoinactivadas (**Figura 2b**). La autoinactivación de la fluorescencia de porfirina se correlaciona directamente con la autoinactivación del oxígeno singlete y, por lo tanto, dentro de la bicapa de porfirina inactivada de PoP-NVs, no tuvieron lugar reacciones químicas fotosensibilizadas para inducir la liberación. La **Figura 3** demuestra que la exposición al láser de NIR se puede utilizar para inducir la permeabilidad de PoP-NV en dicha solución que contiene calceína para permitir la carga (en oposición a la liberación) de la carga, que además apunta a la estabilidad y capacidad inerte de PoP-NVs durante el proceso de permeabilización. La cinética de liberación inducida por láser de NIR se examinó mientras se monitorizaba simultáneamente la temperatura de la solución. En ausencia de la irradiación con láser, la temperatura de la solución se mantuvo constante y no se produjo liberación desde PoP-NVs (**Figura 4a**). Cuando se expuso a la irradiación con láser, las PoP-NVs liberaron su carga en el transcurso de 3 minutos (**Figura 4B**). Sorprendentemente, la liberación desde PoP-NVs se produjo con un cambio mínimo en el calentamiento de la solución en volumen, descartando un mecanismo de transición de fases convencional DSPC o DPPC. De hecho, tal como se muestra en la **figura 5**, en ausencia de irradiación, PoP-NVs podía retener de manera estable su carga cargada a 40, 60 e incluso 90 °C. El 10% molar de fosfolípido HPPH confirió estabilidad térmica porque sin él, los liposomas exhibieron una liberación significativamente mayor a 60 y 90 °C. Debido al dopaje óptimo en PoP-NVs utilizó sólo el 10% molar de porfirina, fue posible comparar directamente las NVs compuestas casi idénticamente, siendo la única diferencia la inclusión del 10 por ciento molar de HPPH libre o fosfolípido HPPH. Ambos tipos de nanovesículas pudieron formarse y de manera estable atraparon calceína. Ambos tipos de nanovesículas también

mostraron una inactivación casi completa de la fluorescencia de HPPH. Aunque los liposomas formados con HPPH libre mostraron cierta liberación específica de luz, tal como se muestra en la **figura 6a**, las PoP-NVs eran más de 5 veces más eficaces en la liberación de la carga en respuesta a la luz y fueron de aproximadamente 150 veces más eficaces cuando se considera la relación de liberación con y sin irradiación de luz. La **Figura 6b** demuestra que cuando se incubaron con suero bovino fetal al 10%, el HPPH libre se transfiere fácilmente desde los liposomas a las proteínas séricas, mientras que las PoP-NVs permanecen autoinactivadas, indicando una falta de intercambio.

A continuación, se examinó si PoP-NVs se podía cargar activamente con doxorubicina. Tal como se muestra en la **figura 7a**, la doxorubicina se pudo cargar usando un gradiente de sulfato de amonio con una eficacia de más del 95%. Tal como se muestra en la **figura 7b**, cuando dox-PoP-NVs se irradiaron con diferentes potencias de láser en un tampón que incluye 10% de suero, la liberación se produjo en una manera dependiente de la dosis de láser. Esta liberación controlable tiene utilidad directa para controlar la liberación in vivo para conseguir la liberación máxima en el microambiente tumoral. Tal como se muestra en la **figura 8**, la velocidad de flujo a través de los capilares tuvo un efecto directo sobre la liberación inducida por luz de PoP-NVs. Los datos de la **figura 9** muestran que la exposición al láser puede provocar un aumento significativo de la velocidad de liberación de la doxorubicina atrapada (en este caso un aumento de 20.000 veces) en condiciones fisiológicas (en este caso 10% de suero, 37 C).

Las PoP-NVs representan un nanosistema robusto para conseguir la liberación inducida por luz. La permeabilización se produjo en ausencia de reacciones químicas o calentamiento de la solución en volumen. Mediante la variación de la potencia del láser, la cantidad de liberación podía ajustarse fácilmente. A diferencia de los sistemas de liberación que dependen directa o indirectamente del calentamiento a través de transiciones de fase, las PoP-NVs ofrecen un alto nivel de control sobre la permeabilización. Se considera que las PoP-NVs serán útiles la liberación accionada por estímulos para el tratamiento de diversas afecciones, incluyendo el cáncer.

25 EJEMPLO 2

En este ejemplo se describen adicionalmente experimentos con PoP-NVs. Se utilizó un sistema de liberación de fármacos controlado externamente basado en liposomas dopado con porfirina-fosfolípido (PoP) y activado directamente por luz de infrarrojo cercano (NIR). Las simulaciones de dinámica molecular de bicapas de porfirina identificaron un nuevo monómero PoP absorbente de luz esterificado a partir de componentes clínicamente aprobados predichos y demostrados experimentalmente que dan lugar a una bicapa más estable. La permeabilización de membrana se podría inducir tras la exposición a irradiación NIR con inclusión liposomal de 10% molar de PoP y se produjo en ausencia de calentamiento en volumen o nanoescala. Los liposomas se volvieron a sellar después de la exposición al láser y la permeabilidad se pudieron modular por variación del dopaje de porfirina-lípido, intensidad de irradiación o duración de la irradiación. Los PoP-liposomas demostraron un control espacial de la liberación de gentamicina atrapada y un control temporal de la liberación de fluoróforos atrapados después de la inyección intratumoral. Después de la administración sistémica, la irradiación con láser mejoró la deposición de la doxorubicina cargada activamente en xenoinjertos de ratón, lo que permite una terapia antitumoral con un tratamiento único eficaz.

Procedimientos: Simulaciones dinámicas moleculares: se simularon membranas fabricadas de dos moléculas diferentes de lípido-porfirina usando dinámica molecular (MD). Cada sistema bicapa se componía de 128 moléculas de la variante piro o HPPH de los porfirina-lípidos. Se añadieron 9640 moléculas de agua para lograr la hidratación completa. Se utilizó el paquete de software GROMACS. Comenzando con el campo de fuerza estándar de átomo unido, los modelos de lípidos se definieron mediante la eliminación de la cola sn-2 de DPPC y su sustitución por el hemo disponible en la base de datos de campo de fuerza. El campo de fuerza GROMOS 53a6 se utilizó para construir las estructuras finales y para modificar el hemo. Este campo de fuerza se ha demostrado que actúa bien en simulaciones de lípidos y péptidos. Se eligieron cargas parciales entre restos análogos en la base de datos de campo de fuerza. El modelo carga puntual simple (SPC) se utilizó para el agua. Las longitudes de enlace se limitaron usando el algoritmo SETTLE con agua y LINCS para los lípidos. Las interacciones de Lennard-Jones fueron tratadas con un algoritmo de conmutación que se inició a 0,8 nm y se utilizó un punto de corte de 0,9 nm. La electrostática fue tratada con el procedimiento de Ewald de malla de partículas utilizando un verdadero corte espacio de 1,4 nm, una interpolación spline beta (de orden 4) y una tolerancia de la suma directa de 1E-6. Los límites periódicos se utilizaron en las tres dimensiones y se utilizó un paso de tiempo de 2 fs. Los sistemas se establecieron mediante la disposición de 64 lípidos por hoja ("leaflet") sobre una red rectangular. La minimización de una energía decente más elevada se realizó antes de la adición de agua y a continuación se repitió. Esto fue seguido por 100 ps de relajación de NVT a 273,15 K utilizando un integrador de dinámica estocástica y 100 ps de relajación de NpT a 310,15 K. Como parte final de la relajación, se desarrolló una simulación de 500 ns de NpT a 310,15 K y 1 bar. Se utilizó el integrador Leaf-frog. Las simulaciones de producción se llevaron a cabo en el conjunto de NpT. La presión y la temperatura se fijaron a 1 bar y 310,15 K, respectivamente utilizando el algoritmo de Parrinello-Rahman con un tiempo de relajación de 0,5 ps para la presión y un algoritmo de reescalado de la velocidad para el acoplamiento de temperatura con un tiempo de relajación de 0,1 ps. Las temperaturas de los lípidos y el agua se acoplaron de forma independiente. Este protocolo de simulación ha demostrado ser fiable para los sistemas de membrana.

Síntesis de PoP-liposomas: Se sintetizó piro-lípido como se ha descrito previamente (Lovell et al, Proc Natl Acad Sci, USA, 102: 17.975-17.980, 2005). El fosfolípido HPPH se sintetizó usando mediante esterificación de HPPH

(purificado como se ha descrito anteriormente) a temperatura ambiente con 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina (liso-C16-PC, Avanti # 855675P) utilizando EDC y 4-dimetilaminopiridina (DMAP; Fisher # AC14827-0250) en cloroformo en una relación molar 1:1:2:2 liso-C16-PC:HPPH:EDC:DMAP. El fosfolípido HPPH resultante se purificó con gel de diol sílice y se liofilizó en una solución de 80 % de t-butanol (Sigma # 360538) y 20% de agua. Se confirmó la pureza con TLC (> 95% de pureza) y se confirmó la identidad con espectrometría de masas (esperado 1114,7; encontrado: 1114,7) y RMN 1H en un espectrómetro Varian Inova 500 MHz. Para generar PoP-liposomas, se prepararon películas secando soluciones de cloroformo que contenían 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC; Avanti # 850365P), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG2K; Avanti # 880120P), fosfolípido HPPH y colesterol (Avanti # 700000P) en las relaciones molares indicadas. La formulación general para PoP-liposomas se basó en 50 % molar de DSPC, 35 % molar de colesterol, 10 % molar de fosfolípido HPPH y 5 % molar de DSPE-PEG2K. Los liposomas que incorporan 10 % molar de HPPH libre se formaron de forma análoga. Se evaporó el cloroformo utilizando una corriente de gas argón o un evaporador rotatorio, seguido de un secado adicional en una cámara de desecador de vacío. La película se rehidrató con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) y se sonicó durante 30 minutos.

15 *Liberación de la carga y carga de PoP-liposomas:* La carga de colorante de autoinactivación se logró mediante hidratación y sonicación de PoP-liposomas con una solución de calceína 100 mM (Sigma # 21030) o solución de sulforrodamina B (VWR # 89139-502) y posterior separación en filtración en gel sobre una columna Sephadex G-75 (VWR # 95016-784). La carga de doxorubicina se logró mediante la extrusión de una película lipídica con una extrusora de lípidos de alta presión (Northern Lipids) con una solución de sulfato de amonio 250 mM. Se apilaron secuencialmente membranas de policarbonato de 0,2, 0,1 y 0,08 µm de tamaño de poro y la solución se pasó a través de la extrusora 10 veces a 60 °C. Se extrajo el sulfato de amonio libre mediante diálisis durante la noche en una solución de sacarosa al 10% con 10 mM de HEPES pH 7,4. La doxorubicina (LC laboratorios # D-4000) se cargó a continuación mediante la adición de una proporción 1:10 de fármaco:lípido y la incubación a 60 °C durante 1 hora. La doxorubicina libre se extrajo mediante diálisis. Para los experimentos de liberación, soluciones de PoP-liposoma de 0,5-2 mg/ml se diluyeron generalmente en un factor de 50-100 para los experimentos de calceína, y 10-20 veces para la liberación de doxorubicina, y la luz pudo pasar libremente a través de la solución sin efectos de filtro interior. Los experimentos de liberación se realizaron utilizando un diodo láser manual de 120 mW a 658 nm o un diodo láser ajustable a 658 nm de 500 mW (LaserGlow) y se llevaron a cabo las irradiaciones, tal como se indica. Cuando se incubaron en suero, se utilizó suero bovino fetal (VWR # 16777-532). La temperatura se midió mediante la inserción de una sonda de termopar de tipo K directamente en la solución durante la irradiación. La liberación de carga se evaluó midiendo la liberación antes y después del tratamiento, incluyendo solubilización con 0,25% de Triton X-100. La liberación se calculó utilizando la fórmula $Liberación = \frac{(F_{FINAL} - F_{INIC})}{(F_{TX100} - F_{INIC})} \times 100\%$. OriginPro 8.5 se utilizó para el ajuste de datos donde se indican las ecuaciones. Se usó un Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments) para el análisis de la dispersión de luz dinámica. Para el control espacial de los experimentos de liberación, un 1% de gel de agarosa se dopó con PoP-liposomas cargados con sulforrodamina B cuando la agarosa se había fundido y enfriado hasta -50 °C, antes de la solidificación. A continuación, se realizó la liberación usando irradiación láser a 658 nm con una máscara preformada impresa sobre papel de transparencia. Se formaron imágenes sobre la agarosa usando un sistema IVIS Lumina II. La liberación de carga usando diferentes velocidades de flujo se realizó en tubo Tygon con un diámetro interno de 0,3 mm y una bomba de jeringa de velocidad variable que operaba a las velocidades indicadas (New Era, # NE-1000). Para la carga de anfotericina B, se formaron liposomas con anfotericina B (VWR # 97061-610) usando el procedimiento de película fina utilizando formulaciones lipídicas de las relaciones molares indicadas compuestas de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1' rac-glicerol) (DSPG; Avanti # 840465X), fosfatidicolina de soja hidrogenada (Avanti # 840058P), fosfolípido HPPH y colesterol. Después de la formulación de liposomas a través de sonicación, las soluciones se filtraron y se determinó la cantidad de anfotericina B en el filtrado y la solución de prefiltrado utilizando fluorescencia con excitación de 365 nm y emisión de 470 nm.

Experimentos de viabilidad celular: Los estudios celulares in vitro se llevaron a cabo mediante la siembra de 10.000 células Panc-1 por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió fármaco (10 µg/ml de doxorubicina en forma libre o PoP-liposomal y/o una cantidad equivalente de PoP-liposomas vacíos sobre la base de la concentración de fosfolípido HPPH), tal como se indica en medio (DMEM, VWR # 16777-200) que contiene 10% de suero bovino fetal. Los pocillos se irradiaron tal como se indica utilizando un láser de 658 nm con un índice de fluencia de 200 mW/cm² durante 5 minutos. Los fármacos y medios se dejaron incubar en medios que contenían suero sin eliminación durante 24 horas. Después de 24 horas, los medios se reemplazaron y la viabilidad celular se evaluó 24 horas más tarde usando el ensayo de XTT (VWR # 89138-264). La viabilidad se calculó midiendo la absorción a 450 nm restando una lectura de fondo a 630 nm y normalizando a las células de control no tratadas utilizando un lector de placas Safire (TECAN).

60 *Crio-microscopía electrónica:* Para realizar los experimentos crio-EM 3,4 µl de muestra fueron depositados en rejillas c-flat™ (CF-2/2-2C) con una capa continua adicional de carbono delgada (5-10 nm). Las rejillas se descargaron con luz en aire a 5 mA durante 15 segundos antes de la adición de la muestra. Las muestras contenían los dox-PoP-liposomas antes y después de la irradiación a una concentración de 5 mg/ml (concentración de dox -1,5 mg/ml) en un tampón con HEPES 10 mM (pH 7,4) y 10% de sacarosa. Las rejillas se transfirieron dos veces y se vitrificaron sumergiéndolas rápidamente en etano líquido a -180 °C usando un Vitrobot (FEI). La cámara de transferencia del Vitrobot se fijó a 25 °C y 100% de humedad relativa. Las rejillas se transfirieron a un microscopio electrónico JEOL

2010F operado a 200 kV utilizando un criosoporte Gatan 914. Las imágenes se registraron en películas Kodak SO-163 en condiciones de dosis bajas (~15-20 e/Å²) con un aumento nominal de 50.000X y un desenfoque de -5 µm. Las micrografías electrónicas se digitalizaron con un tamaño de paso de 12,7 micras en un escáner Nikon Super Coolsan 9000 que producen imágenes con un valor de muestreo de 2,54 Å/píxel.

5

Resonancia de spin electrónico: Se formaron PoP-liposomas con la inclusión de 1% de ácido 5-doxil estérico (Sigma # 253634) en la formulación estándar usando el procedimiento de hidratación de película delgada. Se utilizó un espectrómetro de banda X Bruker ER-200 ESR con una cavidad rectangular TE102 y con un controlador de temperatura con flujo de nitrógeno Bruker B-VT-1000. La frecuencia ESR fue de 9,44 GHz, modulación de campo de 1,9 Gauss, y potencia de microondas de 0,64 mW. El tamaño de la muestra fue de aproximadamente 20 µl en un tubo de cuarzo de diámetro interno de 1 mm a las temperaturas indicadas. Las muestras se irradiaron usando un láser de 200 mW a 658 nm que se centró en la muestra de ESR través de las ranuras de luz en la cavidad ESR de banda X de Bruker, que son condiciones que inducen la permeabilización de PoP-liposoma.

10

15 *Microscopía confocal:* 10.000 células Panc-1 fueron sembradas en portabojos de cámara confocal de 8 pocillos (VWR # 43300-774) en medio DMEM con 10% de suero. 24 horas después, las células se incubaron con 10 µg/ml de doxorubicina en forma libre o PoP-liposomal en DMEM en 10% de suero. Se realizó tratamiento con láser tal como se indica y todos los pocillos se incubaron durante 3 horas adicionales. Se reemplazó el medio y se realizó la obtención de imágenes de células usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 con objetivo de 20x utilizando 20 excitación de 490 nm y emisión de 612 nm.

20

Experimentos de eliminación de bacterias: Los PoP-liposomas formados utilizando el procedimiento de película delgada se cargaron de forma pasiva en una solución de 85 mg/ml de sulfato de gentamicina (Fisher # BP918-1). Tras la sonicación, la gentamicina no atrapada se eliminó con filtración en gel sobre una columna Sephadex G-25 75. La concentración de gentamicina en los liposomas se determinó usando un ensayo de fluorescencia como se describió anteriormente. *B. Subtilis* (Cm+) se cultivó durante la noche en medio LB líquido a 37 °C durante la noche. Los PoP-liposomas y el cultivo de bacterias líquido se combinaron con agar LB fundido en una relación en volumen de 1:30. La temperatura del agar fue de -45 °C con *B. subtilis* y PoP-liposomas. Las placas se vertieron con aproximadamente 5 ml de bacteria-fármaco-agar por placa. Después de la solidificación, las placas se irradiaron con un diámetro del punto de 1,2 cm con 200 mW/cm² durante 10 minutos usando un láser de 658 nm. La placa fue fotografiada 24 horas más tarde.

25

30

Liberación liposomal a partir de tumores después de la administración intratumoral: Tumores Panc-1 se desarrollaron mediante la inyección de ratones desnudos hembra de 20 g (Charles River) con 3x10⁶ células Panc-1 en una dilución 1:1 de matrigel (BD Biosciences) en el flanco trasero de los ratones. Después de varias semanas de crecimiento, los tumores fueron inyectados por vía intratumoral cuidadosamente con sulforrodamina B-pop-liposomas. Las imágenes fueron adquiridas con un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia in vivo (IVIS Lumina II) en los puntos de tiempo indicados con los ratones bajo anestesia inducida con isoflurano. El tumor se irradió durante 30 minutos con un tamaño de punto de diámetro de 0,6 cm a una densidad de potencia de 200 mW/cm² y se obtuvieron imágenes de nuevo de los ratones.

35

40

Tratamientos administrados sistémicamente: se inyectaron células KB (sublínea Hela) en el flanco derecho de ratones desnudos hembra (Jackson Labs). Cuando los volúmenes de los tumores alcanzaron los 4-6 mm de diámetro, se inyectaron dox-pop-liposomas (10 mg/kg dox) o una dosis equivalente de PoP-liposomas vacíos a través de la vena de la cola. 10-15 minutos más tarde, los tumores fueron irradiados durante 12,5 minutos con un láser de 200 mW/cm² (150 J/cm²). Para los estudios de biodistribución, los ratones fueron sacrificados 24 horas más tarde, los tejidos se homogeneizaron, se extrajeron durante la noche en isopropanol ácido y se determinó la biodistribución de dox (doxorubicina) mediante mediciones de fluorescencia con una excitación de 480 nm y una emisión de 590 nm. Para los estudios de supervivencia, el tamaño del tumor se monitorizó 2-3 veces por semana y los ratones se sacrificaron cuando el tumor creció hasta 1 cm en cualquier dimensión.

45

50

Para el análisis farmacocinético, se inyectaron ratones macho BALB/c por la vena de la cola con PoP-liposomas vacíos (15 mg/kg fosfolípido HPPH). Se tomaron muestras de volúmenes de sangre pequeños en puntos submandibular y retroorbital en los puntos de tiempo indicados y el suero se analizó para el contenido de HPPH usando fluorescencia con 400 nm de excitación y 660 nm de emisión después de la dilución en una solución de 0,25% de Triton-X100 para evitar cualquier autoinactivación.

55

Se observó que PoP puede autoensamblarse en nanovesículas de porfirisoma de forma similar a liposomas formadas enteramente de una bicapa de porfirina con carácter biofotónico intrínseco, propiedades ópticas a nanoescala, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Sin embargo, los monómeros de porfirisoma anteriormente descritos no pueden ensamblarse en nanovesículas que cargan de forma estable y retienen la carga sin adición de colesterol. Para superar este inconveniente, la estructura del monómero de sn-1-palmitoil sn-2-pirofeofórbido fosfatidilcolina (piro-lípido) fue examinada. Se investigó si los monómeros basados en desvinil hexiloxietil-pirofeofórbido (HPPH) podrían formar bicapas con un autoensamblaje y propiedades de empaquetamiento superiores.

60

65

Para investigar si las nanovesículas basadas en fosfolípido HPPH podría permitir una mejor carga de la carga, se utilizaron simulaciones de dinámica molecular (MD). Las simulaciones MD han demostrado ser útiles para la determinación de propiedades físicas moleculares y supramoleculares de bicapas lipídicas. La porfirina existente se modificó y los campos de fuerza de lípidos para generar los parámetros de porfirina en lípidos y se realizaron simulaciones MD con un sistema bicapa compuesto de 128 moléculas de piro-lípido o fosfolípido HPPH (marcado en algunas figuras como "HPPH-lípido"). Se añadió agua para producir una capa de 3 nm entre imágenes periódicas de la membrana, lo que requería un promedio de 9640 moléculas de agua por sistema. Tal como se muestra en la **Figura 10a**, la representación de la densidad de bicapa reveló que el fosfolípido HPPH no dio lugar a una bicapa con densidad máxima superior, sino más bien una bicapa más gruesa (3,2 vs 2,9 nm con el criterio de Gibbs-Luzzati). Las simulaciones MD mostraron que el resto hexil éter proporciona el llenado de espacio entre las dos hojas ("leaflets") de bicapa en comparación con la bicapa piro-lípido que tenía la porción central de la bicapa llena solamente con las cadenas de palmitoílo. Una simulación MD de duración extendida (> 500 ns) de la bicapa de fosfolípido HPPH con el resto hexil éter. Las porfirinas en la bicapa piro-lípido parecieron alinearse en pilas de agregados de H, lo que puede contribuir a la inestabilidad. Las interacciones de porfirina-lípido intermoleculares se evaluaron utilizando el enlace de hidrógeno intermolecular. Piro y fosfolípidos HPPH contienen dos donantes de enlaces de hidrógeno situados en el anillo de porfirina y aceptores de enlaces de hidrógeno situados tanto en el anillo de porfirina como en los oxígenos en los ésteres de la cadena principal de glicerol y los oxígenos en el fosfato. Tal como se muestra en la **figura 10b**, tanto piro-lípido como fosfolípido HPPH formaron bicapas con una cantidad equivalente aproximada de enlaces de hidrógeno totales. Sin embargo, hubo una fracción significativa mayor de enlaces de hidrógeno intermoleculares en la bicapa piro-lípido (59% vs 43%). Esto refleja la propensión de la bicapa piro-lípido de formar pilas cara a cara dentro de la bicapa que pueden contribuir a la inestabilidad en la retención de la carga cargada. El parámetro de orden de la cadena (Szz) indica la orientación de la cadena de lípidos con respecto a la bicapa normal. Los valores cercanos a 1 indican una orientación promedio paralela a la bicapa normal y valores más próximos a cero indican una orientación en ángulo cerca de 45 grados desde la bicapa normal. Las posiciones terminales de las cadenas de palmitoílo sn-1 en bicapas de fosfolípido HPPH fueron más ordenadas, tal como se muestra en la **figura 10c**. Por lo tanto, las simulaciones MD sugirieron que las bicapas de fosfolípido HPPH podrían haber mejorado la estabilidad en comparación con las bicapas piro-lípido debido a una bicapa ligeramente más gruesa, la formación de menos agregados intermoleculares y más orden en las cadenas laterales de palmitoílo. Se logró la síntesis exitosa de fosfolípido HPPH. A continuación, se examinó experimentalmente el comportamiento de nanovesículas formadas a partir de piro-lípido o fosfolípido HPPH, junto con 5% molar de PEG-lípido, para mejorar las propiedades fisiológicas. Como ya se observó, las nanovesículas de piro-lípidos hidratadas con una solución de calceína 100 mM no pudieron retener de manera estable el fluoróforo, que no era detectable después del aislamiento de la nanovesícula (**Figura 10b**). Sin embargo, las nanovesículas formadas a partir de fosfolípido HPPH atraparon la calceína con una eficacia de retención elevada, de manera que se mantuvo autoinactivada en las nanovesículas antes de la permeabilización con detergente de 0,25% de Triton X-100. De este modo, las simulaciones MD predijeron correctamente una bicapa más estable a partir de fosfolípidos HPPH, lo que fue demostrado experimentalmente para permitir el atrapamiento robusto de la carga dentro de las nanovesículas.

Con una carga estable de la carga posibilitada por el desarrollo de fosfolípido HPPH, se determinó si la irradiación NIR en el pico de absorción específico de HPPH podría causar la liberación de la carga cargada. La calceína se atrapó a concentraciones de autoinactivación y se utilizó un láser de 658 nm para irradiar muestras durante 3 minutos a 120 mW (densidad de potencia de 240 mW/cm²). Se seleccionó un punto de partida de 5% de diesteiroilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol 2000 (PEG-lípido), 35% de colesterol y 60% diesteiroilfosfatidilcolina (DSPC), ya que esta formulación es similar a las formulaciones liposomales de doxorrubicina estables y clínicamente probadas, y a continuación se sustituyó DSPC incrementalmente por fosfolípido HPPH. Sin ningún dopaje de fosfolípido HPPH, los liposomas permanecieron completamente cargados después de la irradiación láser. Sin embargo, cuando sólo se incluyó 10 % molar de fosfolípido HPPH, se observó la liberación completa de la carga después de la irradiación (**Figura 2a**) b. Inesperadamente, a medida que se titulaba una porción mayor de fosfolípido HPPH en los PoP-liposomas, disminuía la cantidad de permeabilización inducida por la luz, a pesar del carácter óptico superior de la bicapa. Por lo tanto, más allá de una porción óptima, el fosfolípido HPPH tenía un efecto estabilizador sobre la retención de la carga en PoP-liposomas en respuesta a la irradiación con láser. La cinética de liberación inducida por láser en NIR se examinó mientras se monitorizaba simultáneamente la temperatura de la solución. En ausencia de la irradiación con láser, la temperatura de la solución se mantuvo constante a temperatura ambiente y no se produjo liberación de carga (**Figura 4a**). A medida que los PoP-liposomas se exponían a la irradiación NIR, la carga se liberaba de manera constante y por completo en el transcurso de 3 minutos (**Figura 4B**). La liberación de PoP-liposomas se produjo sin ningún aumento significativo en la temperatura de la solución. Esto fue inesperado y representa una desviación de los mecanismos de liberación liposomal activados convencionales que se basan en el calentamiento de la solución para activar las transiciones de fase. Aunque no se observó calentamiento en base a las mediciones de los termopares insertados, el calentamiento que tiene lugar directamente en la bicapa PoP-liposoma no podía ser descartado basado solo en mediciones de la solución en volumen. Para evaluar el calentamiento local, se incorporó un marcador de spin de 1% molar de ácido 5-doxil estérico (5-DSA), una sonda de la resonancia de spin electrónico (ESR) comúnmente usada que mide la fluidez de la bicapa en relación con la temperatura, basado en el índice de volteo de la sonda. 5-DSA que se incorporó en PoP-liposomas produjo un espectro de ESR característico, con un pico central flanqueado por otros más pequeños (**Figura 11A**). Tal como se muestra en la **figura 11b**, la anchura del pico de la característica central se estrechó a

temperaturas elevadas, tal como se espera para un marcador de spin de nitróxido debido al aumento de los índices de volteo. Por lo tanto, 5-DSA proporcionó un medio para evaluar el calentamiento a nanoescala durante la irradiación láser. Mediante la medición de la anchura de pico a valle de la característica espectral central, fue posible el análisis térmico a nanoescala del calentamiento de la bicapa durante la irradiación con láser (**Figura 11c**). En base a las mediciones de ESR calibradas térmicamente, durante las condiciones de irradiación láser que permeabilizaban los PoP-liposomas, no hubo calentamiento apreciable de la bicapa (un cambio de menos de 0,5 °C).

Dado que la permeabilización inducida por NIR no fue impulsada por los efectos del calentamiento en volumen o a nanoescala inducida por láser, se examinó la estabilidad térmica de PoP-liposomas en soluciones calentadas externamente. Previamente, se ha demostrado que los conjugados porfirina-lípido y colesterol-lípido atenúan las transiciones de fase de bicapa lipídicas inducidas por la temperatura (que desestabilizan las membranas). Tal como se muestra en la **Figura 5**, en ausencia de irradiación, los PoP-liposomas podían retener de manera estable su carga cargada a 40, 60 e incluso 90 °C. Esto proporciona una evidencia adicional de que un mecanismo basado en la transición de fases relacionado con la temperatura no es responsable de la liberación inducida por la luz. La termoestabilidad permitió que los PoP-liposomas cargados con sulforrodamina B se incorporaran en agarosa caliente (~ 50 °C) antes de la solidificación sin fugas. Se podría utilizar un láser de 658 nm para lograr un excelente control espacial de permeabilización y liberación de sulforrodamina B dentro de la agarosa solidificada (**Figura 12**). Para obtener una visión de la naturaleza de la liberación inducida por la luz, se examinó si el fosfolípido HPPH estaba contribuyendo específicamente a la liberación a través de efectos supramoleculares concertados, o si el fosfolípido HPPH estaba actuando simplemente como un componente de transducción fototérmico absorbente de la luz dentro de la bicapa. La formación de liposomas resulta físicamente imposible y se produjo una gran agregación cuando más del 15% molar porfirina libre está incluido en la formulación. Sin embargo, debido a que el dopaje óptimo en PoP-liposomas utilizó sólo el 10% molar de porfirina, fue posible comparar directamente liposomas compuestos idénticamente, excepto por la inclusión de 10% molar de HPPH libre o fosfolípido HPPH. La filtración en gel demostró que el HPPH libre, que tiene una solubilidad en agua mínima, se incorporó totalmente en los liposomas (**Figura 17**). Ambos tipos de liposomas se podían formar y atrapar de manera estable la calceína. Ambos tipos de liposomas exhibieron una inactivación de la fluorescencia de HPPH de más del 90% en comparación con los liposomas alterados con detergente-interrumpido (**Figura 18**), creando un sistema comparativo, ya que la autoinactivación de la fluorescencia está correlacionada con eventos aguas abajo, tales como la inactivación de la generación de oxígeno singlete. Cuando se irradia con luz NIR, los liposomas que contienen HPPH libre mostraron una liberación inducida por la luz limitada y los PpP-liposomas fueron más de 5 veces más eficaces en la liberación de la carga (**Figura 6a**). Teniendo en cuenta la alta tasa de fuga de base de liposomas que contienen HPPH libre, los PoP-liposomas eran 150 veces más eficaces con respecto a la relación de liberación después de la irradiación con láser para liberar en ausencia de estímulos desencadenantes. Esto demuestra que las limitaciones conferidas por el fosfolípido HPPH dentro de la bicapa de porfirina juegan un papel activo en la liberación. La presencia de 10% molar de fosfolípido HPPH en la bicapa no inhibió la solubilización de un fármaco que se divide en la membrana, la anfotericina B en una formulación clínicamente usada de ese fármaco (**Figura. 19**). Cualquier cromóforo de NIR (incluyendo HPPH libre) se podría cargar en bicapas de liposomas y utilizarse para inducir algún grado de liberación sensible a la luz. Cuando se incubaba con suero, el HPPH libre incorporado en liposomas se transfirió rápidamente a los componentes del suero y se inactivó completamente en fluorescencia en 30 minutos (**Figura 6b**). En cambio, los PoP-liposomas se mantuvieron autoinactivados, lo que indica una falta de intercambio detectable de fosfolípido HPPH con componentes del suero. Después de la administración intravenosa en ratones BALB/c, los PoP-liposomas mostraron una vida media circulante en un solo compartimiento larga de 14,4 horas (**Figura 20**). Esto es similar a la vida media circulante en un solo compartimiento de 12-13 horas observada previamente de nanovesículas de porfisoloma que contienen 60% molar de piro-lípido, aunque algo más corta que algunas formulaciones de liposomas PEGilados estabilizados estéricamente para suministro de doxorubicina, que pueden presentar vidas medias de circulantes de 20 horas en ratones.

Para enfatizar el control espacial y temporal de la liberación y demostrar la utilidad de amplio alcance de PoP-liposomas, se desarrollaron experimentos para aplicaciones antibacterianas y antineoplásicas. Los liposomas tienen propiedades atractivas para la administración de fármacos antibacterianos y la gentamicina, un antibiótico aminoglucósido común, se podría cargar de forma pasiva en el interior de POP-liposomas. Debido a su estabilidad térmica, los gentamicina-pop-liposomas podrían impregnarse en agar caliente antes de la solidificación junto con *Bacillus subtilis*, un modelo de bacterias gram positivas. Tal como se muestra en la **figura 13a**, cuando se impregna con 10 µg/ml de gentamicina-pop-liposomas (basado en la concentración de gentamicina), la liberación del fármaco específica en el agar se produjo después de la exposición al láser y se consiguió la eliminación completa de bacterias dentro del punto irradiado. Además, también se observó una zona de inhibición de 6 mm fuera del área irradiada debido a la difusión del fármaco dentro del agar. De manera significativa, las zonas no irradiadas fuera de la zona de inhibición demostraron un gran crecimiento bacteriano, a pesar de la presencia de concentraciones igualmente altas de gentamicina (atrapada) en todo el agar. Debido a que incluso una dilución de 10 veces de los gentamicina-pop-liposomas mantenía una eliminación activada por la luz (**Figura 13a**), la falta de muerte celular en las zonas no irradiadas de la placa de alta concentración refleja la eficacia de atrapamiento estable de PoP-liposomas. Las placas de agar de control impregnadas con PoP-liposomas vacíos no mostraron un efecto antibacteriano activado por luz significativo. Por lo tanto, los gentamicina-PoP-liposomas demostraron un control espacial eficiente de la liberación de antibiótico que puede no ser alcanzable tal como se usa fácilmente o

directamente con cualquier otro procedimiento de liberación activada. Para demostrar una aplicación para el control temporal de la liberación de la carga, se inyectaron sulforodamina B libre o sulforodamina B-PoP-liposomas por vía intratumoral en ratones desnudos con xenoinjertos de Panc-1 subcutáneos. Debido a su tamaño mayor en relación con moléculas pequeñas, los liposomas no drenan rápidamente desde los tumores después de la inyección directa y por esa razón han demostrado potencial como un vehículo de administración de fármaco intratumoral. Los PoP-liposomas podrían añadir una nueva capa de control para activar la liberación liposomal después de la redistribución liposomal dentro de los tumores. Como se ve en la **figura 13b**, después de la inyección intratumoral de rodamina libre, la molécula drena rápidamente desde el tumor, con poca fluorescencia restante en el tumor 2 horas después de la inyección. Se pueden usar nanopartículas más grandes (100-200 nm) para ralentizar considerablemente la velocidad de drenaje del orden de horas en lugar de minutos. Los sulforodamina B-PoP-liposomas se encuentran en este rango de tamaño y se formaron con concentraciones de autoinactivación del fluoróforo. 2 horas después de la inyección intratumoral, el tumor se irradió y se pudo visualizar claramente la sulforodamina B liberada después de su activación. Esto demostró que no sólo el tamaño de los liposomas modula la distribución del tumor después de la inyección intratumoral, sino que los PoP-liposomas eran suficientemente estables in vivo para permitir la liberación de contenido sólo después del tratamiento con luz después de un período de incubación de 2 horas.

La carga de fármaco liposomal activa usa gradientes iónicos y de pH para concentrar los fármacos en el interior acuoso de los liposomas. A continuación, se examinó si la carga de doxorubicina activa era posible utilizando PoP-liposomas, dada la naturaleza de estabilización de la bicapa dopada con porfirina. Como se muestra a partir de los resultados de filtración en gel de la **Figura 14a**, la doxorubicina se pudo cargar activamente con más del 95% de eficacia tras la incubación a 60 °C durante 1 hora utilizando un gradiente de sulfato de amonio interno. La **Figura 14b** muestra que después de la irradiación, la doxorubicina, pero no el fosfolípido HPPH, se liberó de los PoP-liposomas. Cuando dox-pop-liposomas se irradiaron en tampón salino incluyendo suero bovino fetal al 10%, la liberación se produjo de una manera dependiente de la dosis de potencia del láser y el tiempo de irradiación (**Figura 14C**). Cabe destacar que además de variar las características de liberación mediante la modulación del dopaje de porfirina y el tiempo de irradiación, la potencia del láser podría afectar directamente a la liberación. Sobre un amplio intervalo de índices de fluencia, la liberación de doxorubicina aumentó con el aumento de los tiempos de irradiación (**Figura 21a**). A diferencia de la terapia fotodinámica, en la que índices de fluencia mayores producen efectos más bajos debido al agotamiento del oxígeno molecular, la liberación completa de doxorubicina desde PoP-liposomas dependía de la fluencia total (~ 85 J/cm²) y el tiempo requerido para la liberación completa se podría predecir en función del índice de fluencia (**Figura 21b**). A diferencia de los mecanismos basados en la transición de fases que están restringidos al calentamiento de zonas diana a temperaturas establecidas, la variación de la potencia del láser agrega una nueva capa potente de control directo a la liberación activada. Esto podría ser explotado mediante el control de la liberación en microvasos de tamaños diana específicos, ya que cuando los PoP-liposomas se irradiaron en un tubo capilar en fluencia, la liberación era dependiente de la velocidad de la solución (**Figura 8**). La liberación controlada tiene ventaja para la doxorubicina en particular, ya que las formulaciones liposomales clínicas de doxorubicina han demostrado tener una velocidad de liberación lenta que da lugar a sólo el 50% de biodisponibilidad incluso después de una semana in vivo, lo que limita la eficacia terapéutica. La **Figura 14d** muestra que in vitro, no hubo una liberación mínima de PoP-liposomas cargados con doxorubicina a lo largo de una incubación de 48 horas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando la muestra se sometió a irradiación con láser de 300 mW, 658 nm, la liberación completa se produjo en tan sólo 4 minutos. Esto se compara favorablemente con los sistemas basados en transición de fases, tales como liposomas activados térmicamente, que generalmente presentan una aceleración de -10 veces en la liberación en condiciones fisiológicas cuando se comparan los estados "on" frente a "off". La **Figura 14e** demuestra que dox-PoP-liposomas podrían utilizarse para inducir la inhibición activada por luz de la viabilidad de las células Panc-1. El tratamiento con láser en presencia o ausencia de PoP-liposomas vacíos no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular. Sin tratamiento con luz, los dox-pop-liposomas, incubados con las células durante 24 horas en 10% de suero a 37 °C, indujeron una pequeña cantidad (~ 15%) de inhibición de la viabilidad celular. Este fue probablemente debido a cierta captación de los liposomas cargados con el fármaco en la incubación de duración extendida. Sin embargo, cuando los dox-pop-liposomas se trataron con 200 mW/cm² durante 5 minutos, se observó una inhibición significativa (> 50%) de viabilidad celular, que era incluso más eficaz que el fármaco libre. La razón de una eficacia superior de la doxorubicina liberada en comparación con el fármaco libre no está claro, pero una explicación podría ser que el fármaco libre se unía a las proteínas de suero, lo que impactaba en la captación celular, mientras que la presencia de PoP-liposomas puede haber interferido con ese proceso. La microscopía confocal reveló que la liberación activada por luz de dox-pop-liposomas dio lugar a que la doxorubicina estaba biodisponible y se translocaba al núcleo celular de células de cáncer de páncreas Panc-1 cuando se incubaron en el suero durante 3 horas (**Figura 22**).

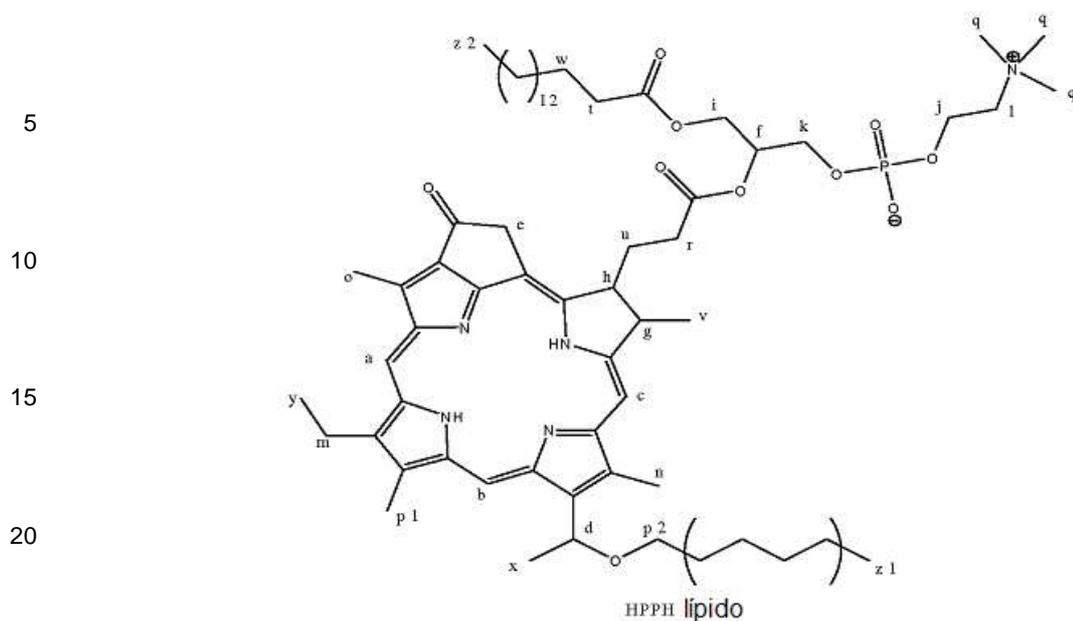
A continuación, se investigaron los conocimientos mecánicos en las propiedades de liberación activada por luz. Criotem (TEM) reveló que los dox-pop-liposomas contenían cristales de sulfato-doxorubicina fibrosos característicos dentro de su núcleo (**Figura 15a**). Después de la irradiación láser, no sólo se liberó la doxorubicina desde los PoP-liposomas, sino que claramente se volvieron a formar con una bicapa intacta, proporcionando una evidencia directa de la propensión de los PoP-liposomas para abrir y a continuación cerrar en respuesta a luz NIR. La confirmación adicional de un mecanismo de permeabilización no destructivo, no se observó ningún cambio en el tamaño del liposoma, polidispersidad y el potencial zeta después de la irradiación NIR de dox-pop-liposomas (**Figura 15b**). Para probar la hipótesis de que las membranas se volvían a sellar de forma estable después de la irradiación, las PoP-

liposomas cargadas con calceína se irradiaron intermitentemente, y se examinó en tiempo real la liberación durante periodos "on" y "off" del láser. Tal como se muestra en la **figura 15c**, la liberación de calceína de liposomas se produjo sólo durante la irradiación y cesó en segundos después de desconectar el láser. Se observó una liberación insignificante en los periodos sin irradiación láser. Esto sugiere que los PoP-liposomas rápidamente se volvieron a sellar y volvieron a formar bicapas de forma estable tan pronto como la irradiación se detuvo, ya que si se producía la desestabilización permanente, se esperaría un cierto nivel de liberación de base inmediatamente después del paro del láser. Esto proporciona evidencia contra un mecanismo de liberación basado en fotorreacción química covalente dentro de la bicapa. Más evidencia se muestra en la **Figura 15d**, lo que demuestra que la exposición al láser NIR podría ser utilizada para inducir la permeabilidad temporal, con liposomas capaces de resellar y atrapar contenidos externos. Esto no sería posible si el láser estaba induciendo reacciones que causaban la inestabilidad de la bicapa lipídica permanente. Cuando se colocaron PoP-liposomas vacíos en una solución que contenía calceína y se sometieron a irradiación con láser, la calceína podía difundirse en los liposomas y mantenerse ahí de forma estable, lo que demuestra que podría utilizarse la permeabilización transitoria para permitir la carga (en oposición a la liberación) de la carga. Sólo se logró una carga mínima (0,012% de calceína externa), aunque esto se podría aumentar mediante el aumento de la concentración de PoP-liposomas. En estas condiciones, se observó un fotoblanqueo mínimo (~ 5%). Esto representa un nuevo procedimiento para la carga de la carga.

La utilidad potencial de dox-pop-liposomas para una terapia administrada sistémicamente se evaluó en ratones desnudos con tumores KB subcutáneos. Los ratones fueron inyectados con dosis de 10 mg/kg de dox-pop-liposomas. 15 minutos después de la inyección IV, los tumores se irradian con luz láser de 658 nm a 200 mW/cm² durante 12,5 minutos (150 J/cm²), o no fueron irradiados como control. 24 horas más tarde, se recogieron los órganos y se evaluó la biodistribución de doxorubicina. Como se muestra en la **figura 16a**, el tratamiento con láser dio como resultado la deposición de alrededor de 3 veces más de doxorubicina en comparación con los tumores no irradiados, mientras que ninguno de los otros órganos mostró diferencias estadísticamente significativas. Se observó una mejora significativa de la deposición de la doxorubicina en otros tejidos irradiados por láser, tales como en la piel que cubre el tumor, así como en el músculo que estaba inmediatamente adyacente al tumor. Esto pone de relieve los retos clínicos que requerirán un suministro cuidadoso de luz específicamente al tumor, y no a órganos críticos adyacentes. Mientras que la inyección intratumoral seguido de irradiación (**Figura 13b**) definitivamente demostró que los PoP-liposomas son capaces de la liberación activada por luz in vivo, los resultados de biodistribución son más complejos de interpretar. Además de la liberación directa de fármacos, la mejora observada en la deposición de doxorubicina en el tumor podría haber sido influenciada por otros factores, incluyendo la permeabilidad mejorada del tumor debido al daño vascular inducido por la liberación inicial del fármaco y también de los efectos fotosensibilizantes de los PoP-liposomas durante la irradiación. Se ha demostrado que PDT usando HPPH mejoró la deposición en el tumor de DOXIL® en un modelo de carcinoma de colon murino. Los estudios futuros tratarán de comprender mejor cómo estos múltiples factores contribuyen a la deposición mejorada en el tumor de doxorubicina en PoP-liposomas. Basándose en los resultados de biodistribución favorables, se realizó un estudio de supervivencia basado en un tratamiento intravenoso individual de dox-pop-liposomas (dosis de 10 mg/kg de doxorubicina). Los ratones se dividieron en 4 grupos: (1) dox-PoP-liposomas con tratamiento con láser, (2) pop-liposomas vacíos con tratamiento con láser, (3) dox-pop-liposomas sin tratamiento con láser; y (4) control de solución salina. Como se muestra en la **figura 16b**, sólo los dox-pop-liposomas con el tratamiento con láser curaron eficazmente tumores. 4 de los 5 ratones tratados presentaban tumores curados de forma permanente sin nuevo crecimiento después de 90 días. Después del tratamiento con láser, los dox-PoP-liposomas y PoP-liposomas vacíos indujeron la formación de escaras en la piel del tumor, lo que demuestra que los PoP-liposomas por sí mismos tiene propiedades fotosensibilizantes. Sin embargo, los PoP-liposomas vacíos irradiados son ineficaces en la detención del crecimiento del tumor. Del mismo modo, una sola dosis de dox-pop-liposomas sin tratamiento con láser también fue ineficaz en la detención del crecimiento del tumor. De este modo, sólo el tratamiento con láser de dox-pop-liposomas era un tratamiento eficaz que da lugar a regresiones tumorales completas. Ningún ratón tratado mostró signos de fototoxicidad bajo iluminación ambiente (no se tomaron precauciones especiales de alojamiento), y los PoP-liposomas están autoinactivados, a la vez que intactos.

RMN de fosfolípido HPPH

55



25

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 9,79 (a) (d, $J = 11,2$ Hz, 1H, meso-H), 9,40 (b) (s, 1H, meso-H), 8,54 (c) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, meso-H), 5,92 - 5,85 (d) (m, 1H, $\text{CH}(\text{o-hexil})\text{CH}_3$), 5,36 - 5,20 (e) (m, 2H, anillo exocíclico), 5,13 (f) (dd, $J = 19,7$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 4,50 (g) y 4,30 (i) (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, COOCH_2CH), 4,39 (h) (s, 1H, $\text{CH}(\text{CH})\text{CH}_2$), 4,30 (j) (s, 1H, $\text{CH}(\text{CH})\text{CH}_2$), 4,18 - 4,06 (k) (t, 12,8, 2H, OCH_2CH_2), 3,84 (l) (d, $J = 23,2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH})(\text{PO}_4)$), 3,66 (m) (d, $J = 7,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3,57 (n) (m, 2H, CH_2CH_3), 3,38 (o) (s, 3H, C- CH_3), 3,33 (p) (s, 3H, C- CH_3), 3,27 (q1) (s, 3H, C- CH_3), 3,27 (q2) (t, 11,6, 2H, OCH_2), 3,08 (r) (s, 9H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 2,75 (s) (m, 2H, CH_2COO), 2,26 - 2,16 (t) (t, 14,7, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)\text{COO}$), 2,11 (u) (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH})\text{CH}_2\text{COO}$), 1,81 (v) (dd, $J = 4,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)(\text{CH}_2)_{12}$), 1,73 (w) (d, $J = 22,4$ Hz, 3H, CH_3CH), 1,68 (x) (t, $J = 7,5$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1,49 (y) (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3CH), 1,36 - 0,95 (z) (varios H, $(\text{CH}_2)_{12}$ y $(\text{CH}_2)_4$), 0,86 (a1) (t, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 0,79 (b1) (s, 3H, CH_3CH_2), -1,74 (br, 1H).

30

35

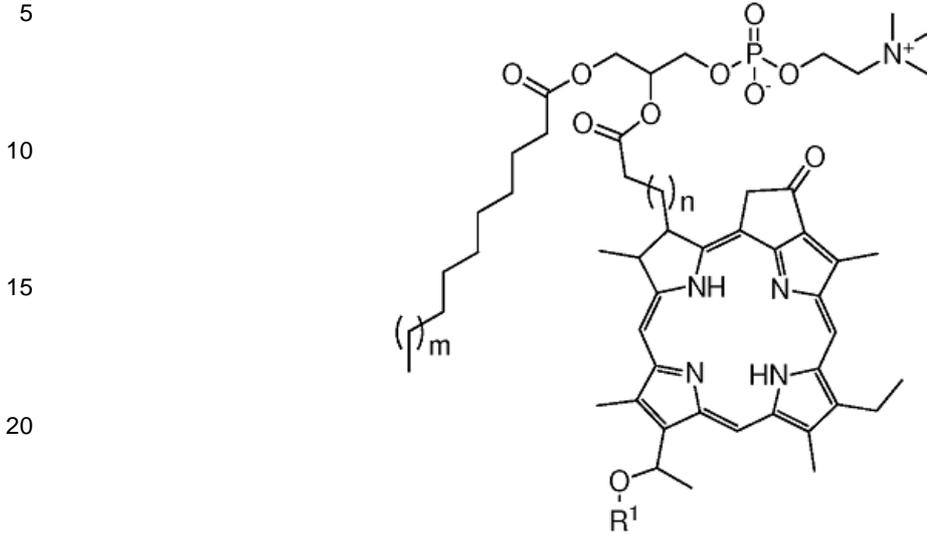
En resumen, las PoP-NVs como se describen en el presente documento forman un sistema robusto que conseguía la retención de carga termoestable, así como la liberación efectiva después de la exposición a dosis clínicamente relevantes de radiación en NIR. La liberación podría ajustarse variando el dopaje de porfirina, el tiempo de radiación láser y la potencia de la radiación láser. Esto representa una desviación de los sistemas de liberación activados externamente que se basan en el calentamiento hasta unos pocos grados por encima de la temperatura corporal y pueden tener problemas con la estabilidad a temperaturas fisiológicas. En respuesta a la radiación en NIR, las PoP-NVs de la presente descripción liberaban su carga con un control robusto espacial y temporal y cuando está cargado con agentes apropiados proporcionan un tratamiento eficaz y opciones de diagnóstico.

40

45

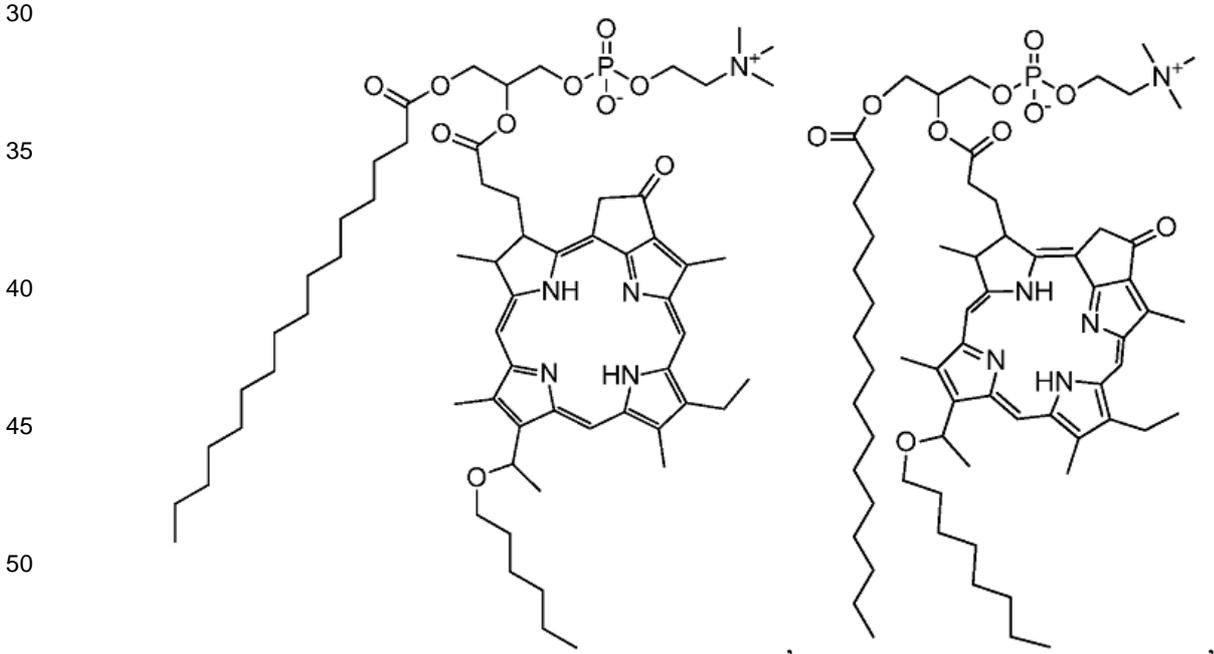
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende nanovesículas, comprendiendo dichas nanovesículas una bicapa que comprende un conjugado de porfirina que tiene la siguiente estructura:

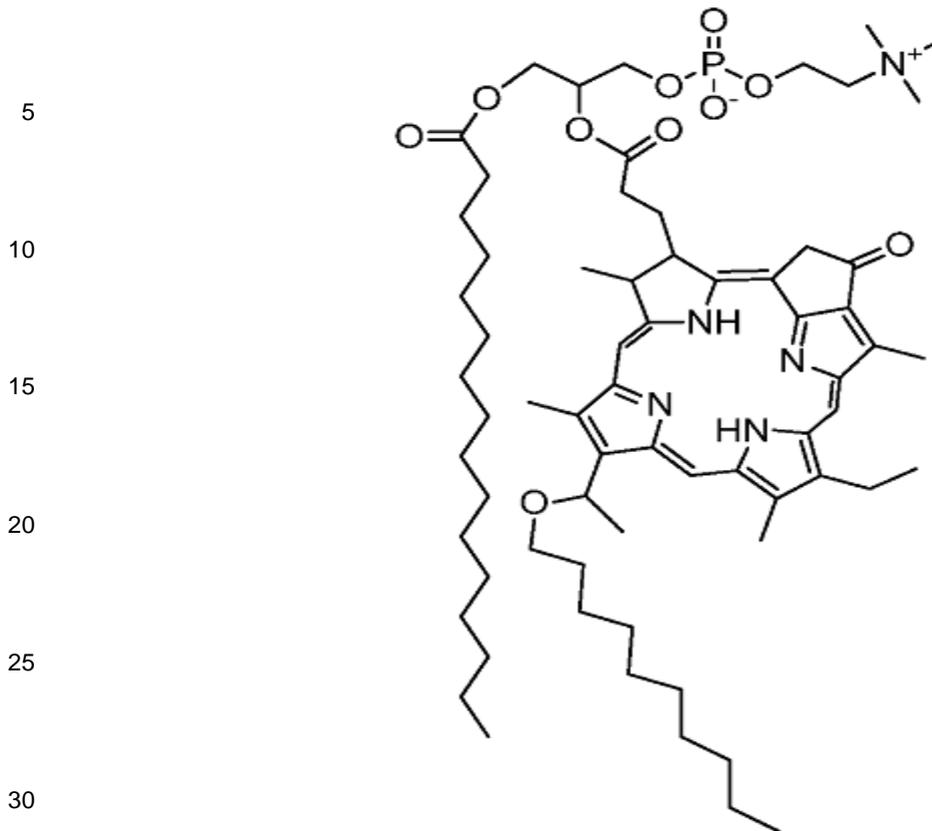


25 en la que m es un número entero de 1 a 12, n es un número entero de 1 a 12, y R¹ es un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de 2 a 20 átomos de carbono.

2. Composición, según la reivindicación 1, en la que el conjugado de porfirina se selecciona de entre una de las siguientes estructuras:



55 y



3. Composición, según la reivindicación 1, en la que las nanovesículas tienen un tamaño promedio de 30 a 250 nm.
4. Composición, según la reivindicación 1, en la que la bicapa de la nanovesícula comprende de 0,1 a 14,4 % molar del conjugado de porfirina.
5. Composición, según la reivindicación 1, en la que la bicapa de la nanovesícula comprende de 15 a 100 % molar del conjugado de porfirina.
6. Composición, según la reivindicación 4, en la que la bicapa de la nanovesícula comprende de 9,5 a 10,5 % molar del conjugado de porfirina.
7. Composición, según la reivindicación 1, en la que la bicapa comprende además uno o más de diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE), DSPE-polietilenglicol (DSPE-PEG) o colesterol.
8. Composición, según la reivindicación 1, en la que las nanovesículas se cargan con carga, liberándose dichas nanovesículas después de la exposición de las nanovesículas a radiación electromagnética de 650 a 1000 nm.
9. Composición, según la reivindicación 8, en la que la carga comprende un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.
10. Composición, según la reivindicación 8, en la que la carga comprende doxorubicina.
11. Composición, según la reivindicación 2, para usar en un procedimiento de tratamiento o diagnóstico de un individuo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- administrar al individuo la composición de tal manera que entra en el sistema circulatorio;
 - permitir que las nanovesículas alcance el punto deseado;
 - exponer las nanovesículas a radiación del infrarrojo cercano de longitud de onda de 650 a 1000 nm de tal manera que la carga se libera de las nanovesículas.
12. Composición para usar, según la reivindicación 11, en la que la composición se administra al individuo por vía intravenosa.
13. Composición para usar, según la reivindicación 11, en la que el individuo es un mamífero humano o no humano.

14. Composición para usar, según la reivindicación 11, en la que las nanovesículas se exponen a una longitud de onda de 658, 665 o 671 nm.
- 5 15. Composición para usar, según la reivindicación 11, en la que las nanovesículas están expuestas a la radiación de infrarrojo cercano durante hasta 30 minutos.

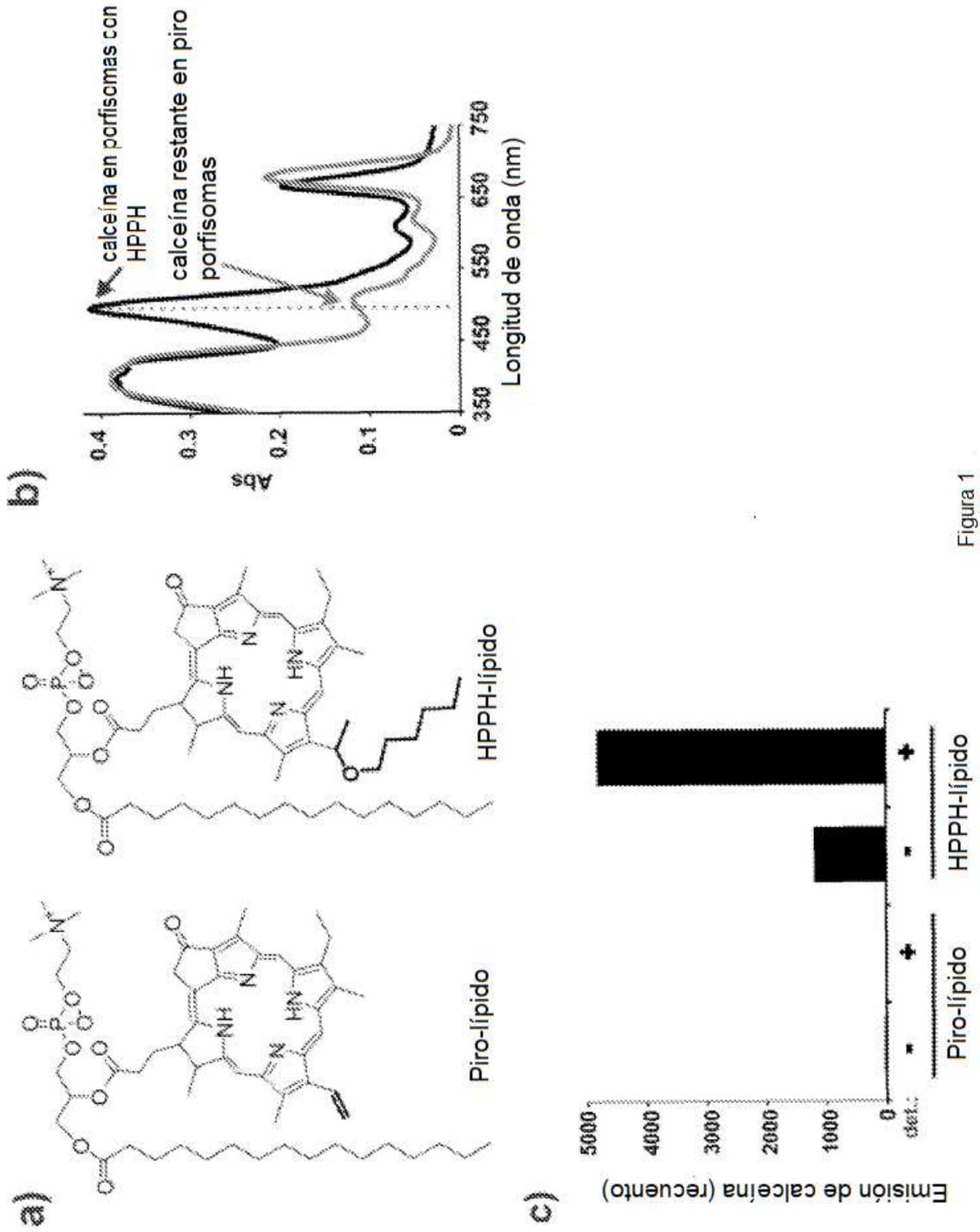


Figura 1

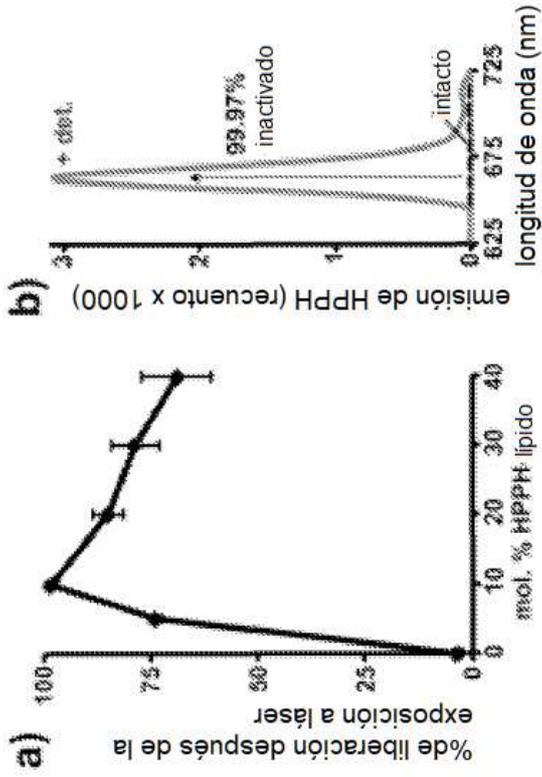


Figura 2

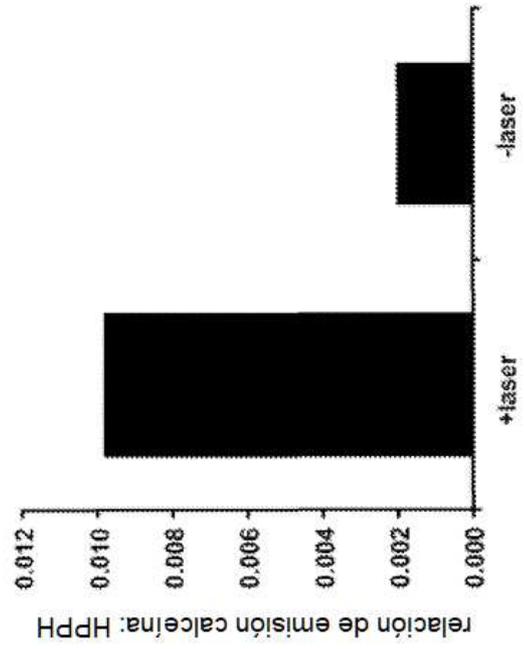


Figura 3

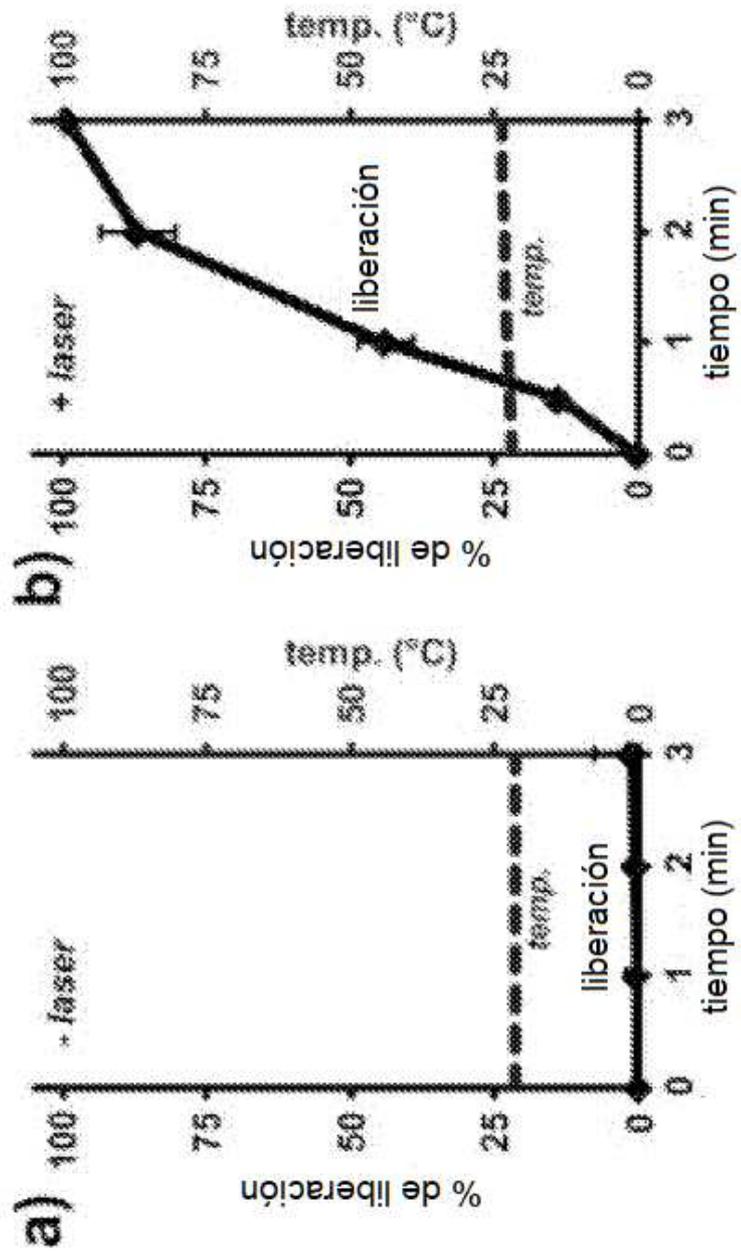


Figura 4

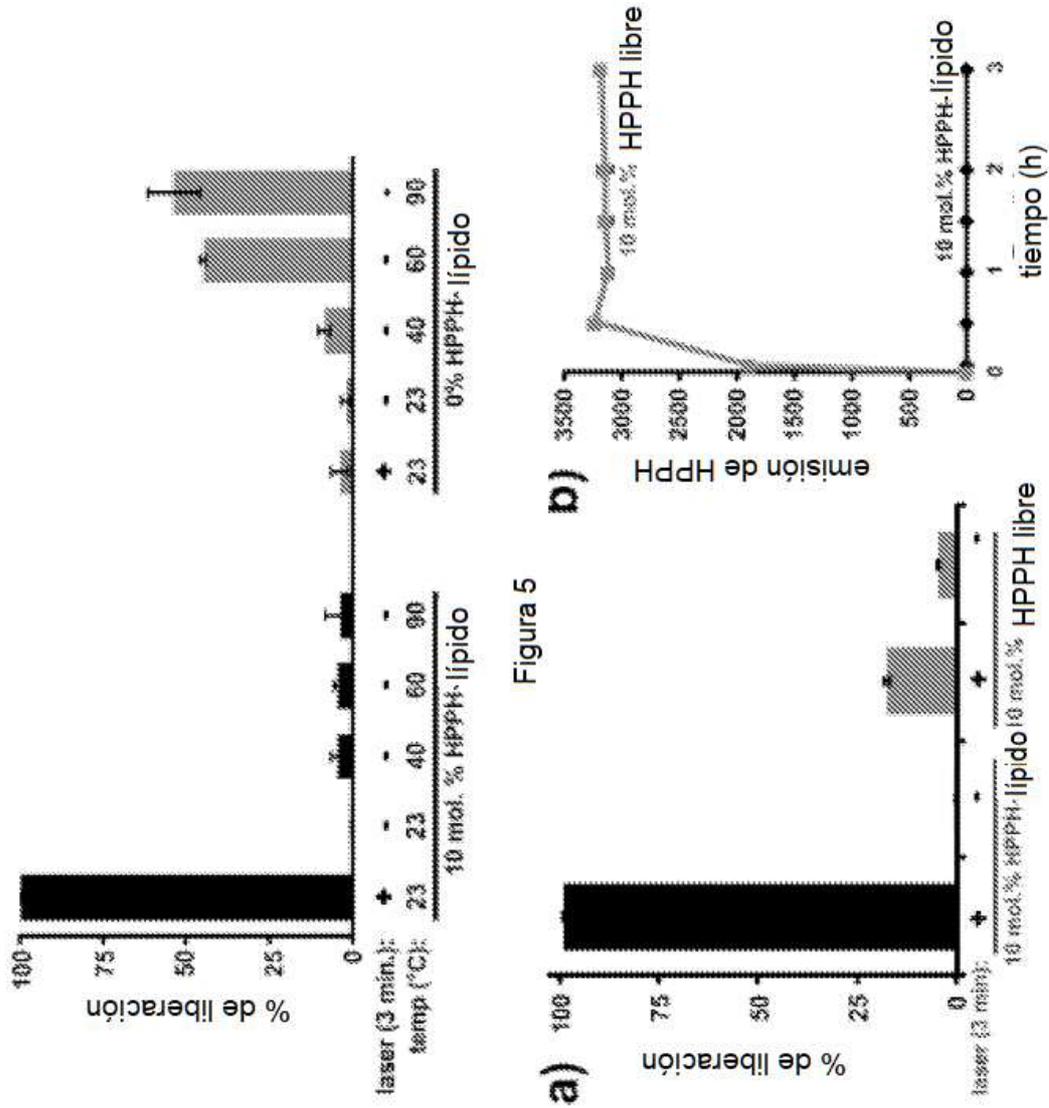


Figura 5

Figura 6

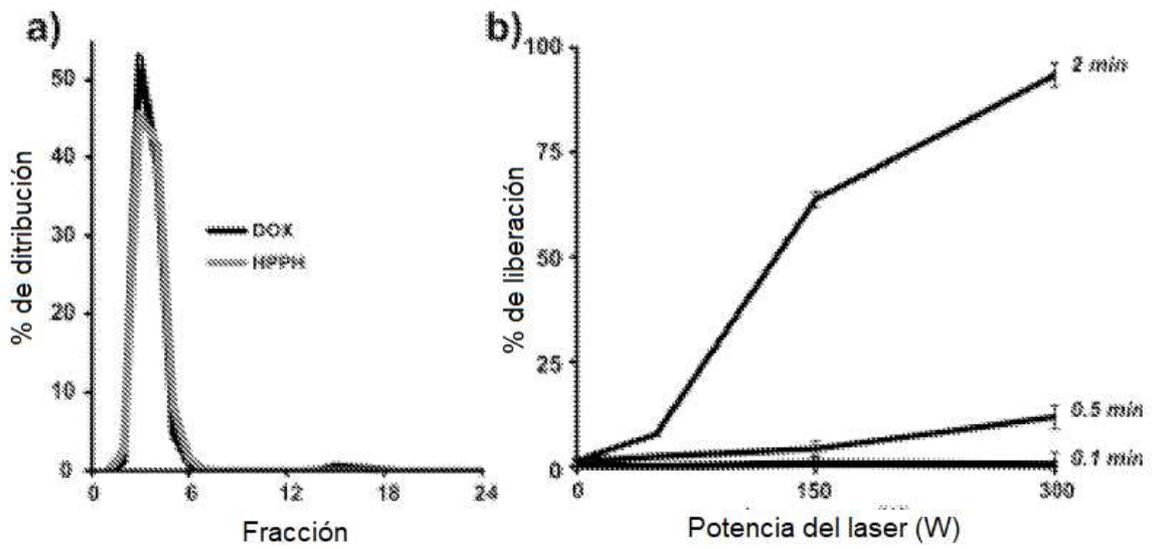


Figura 7

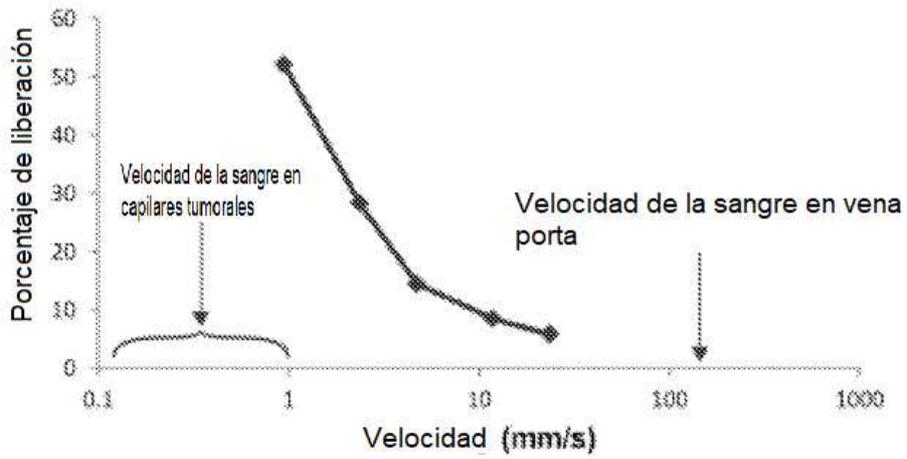


Figura 8

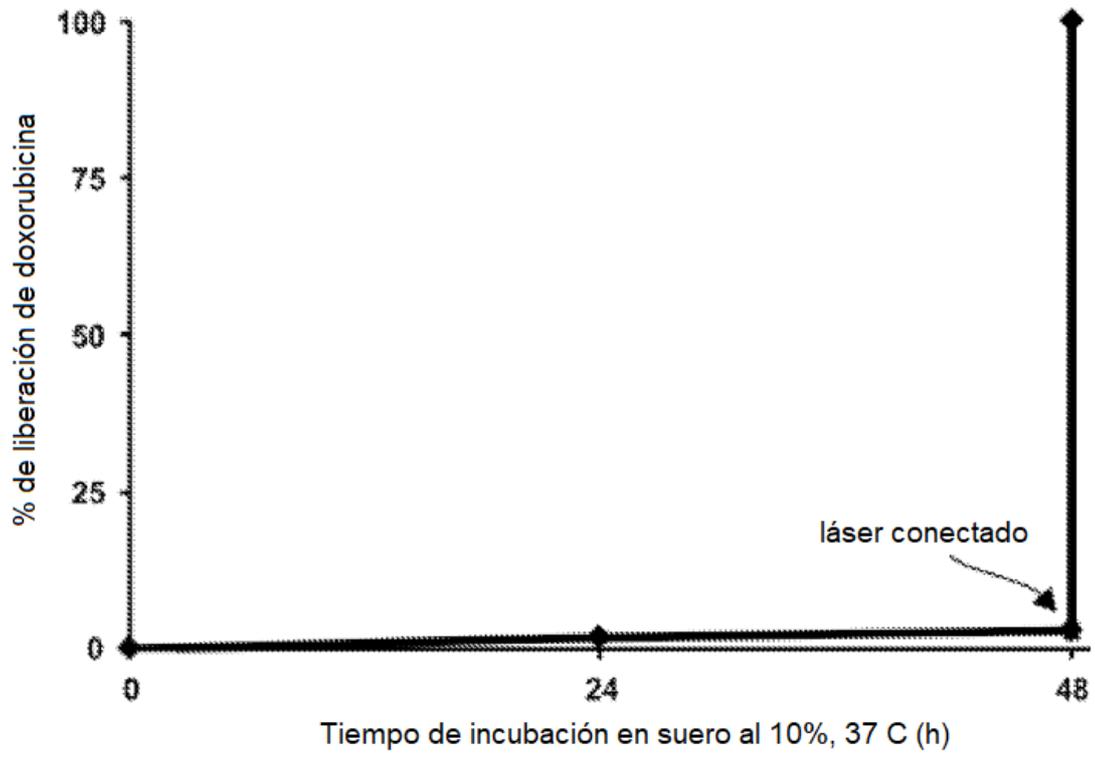


Figura 9

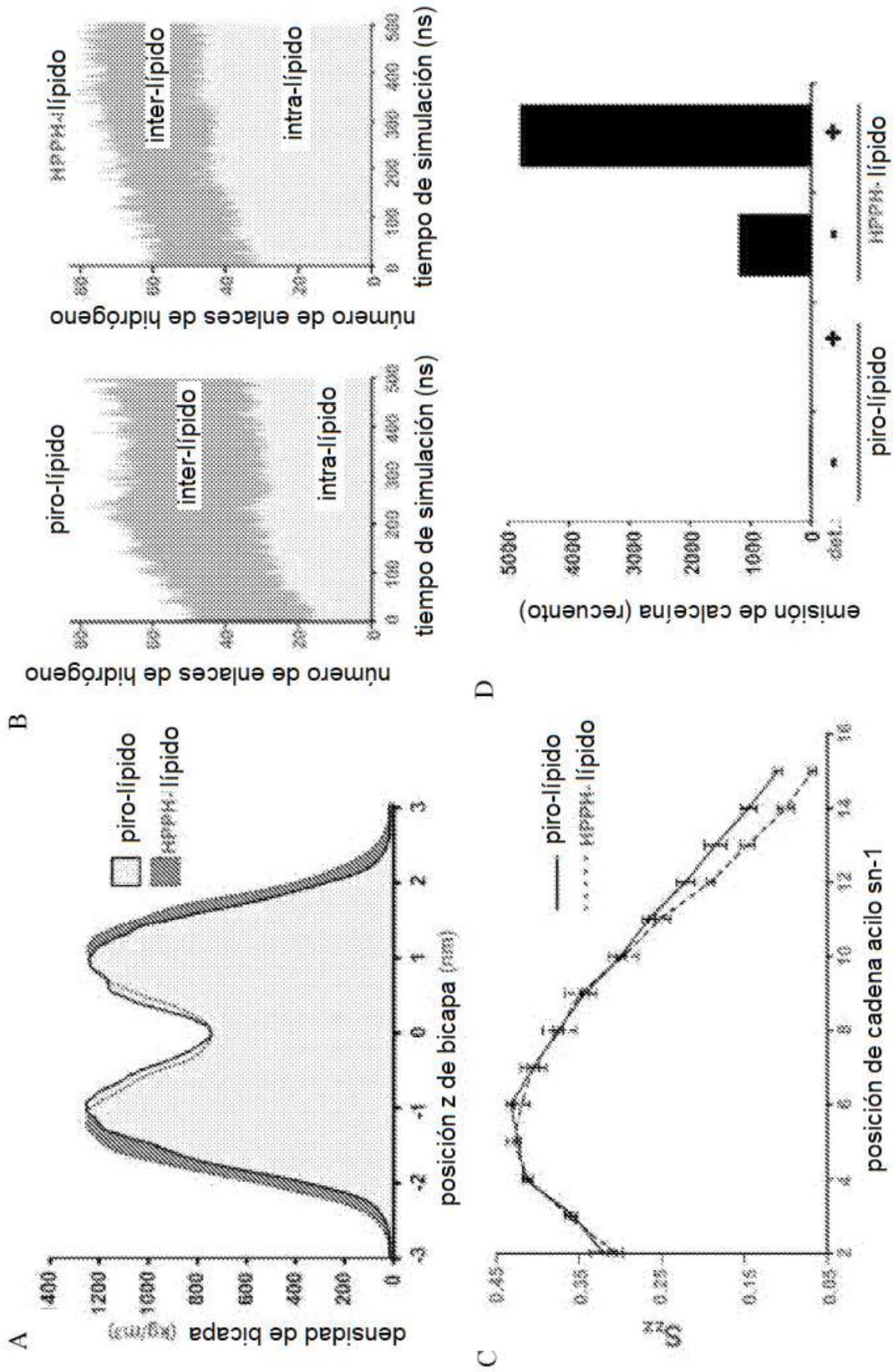


Figura 10

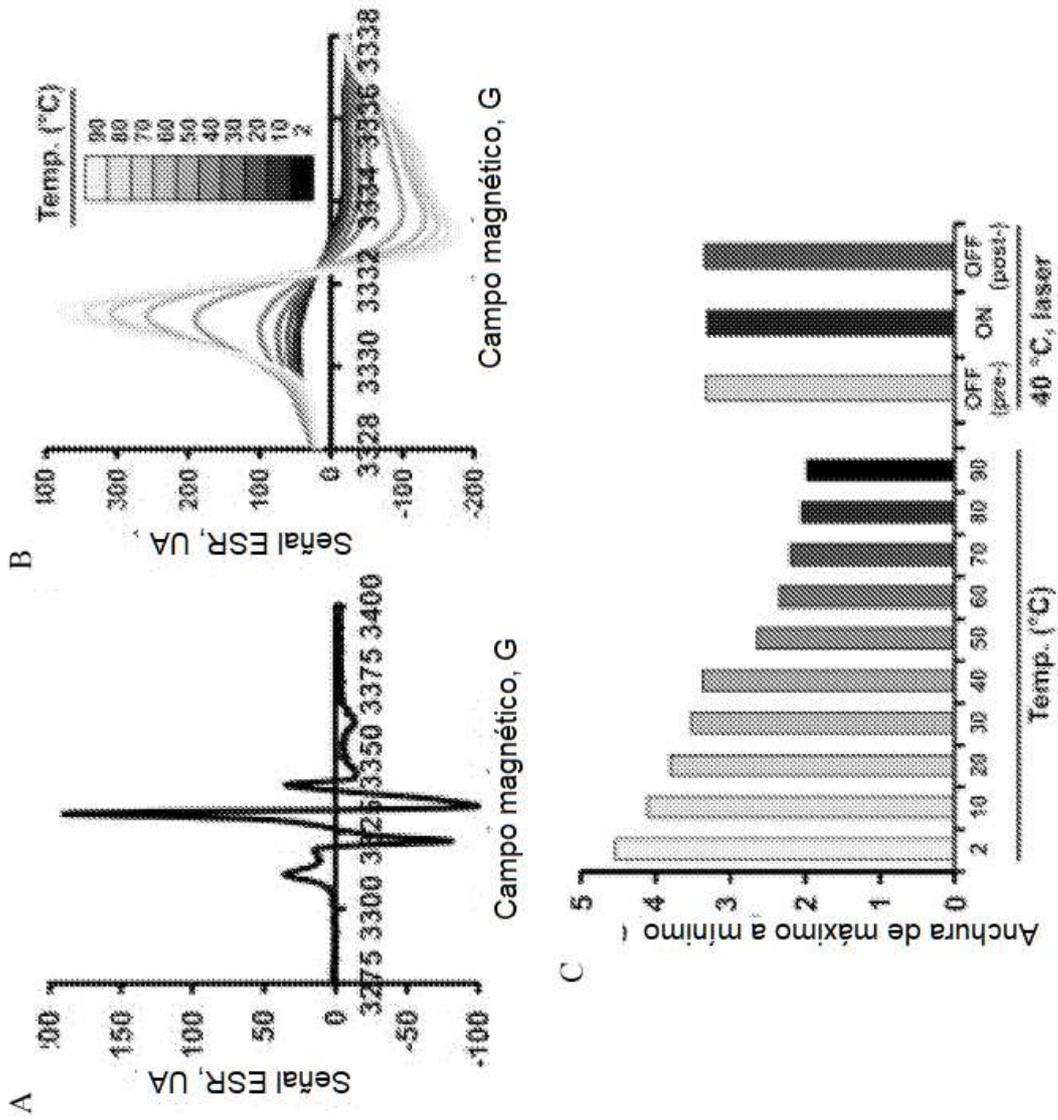


Figura 11

k

Luz blanca

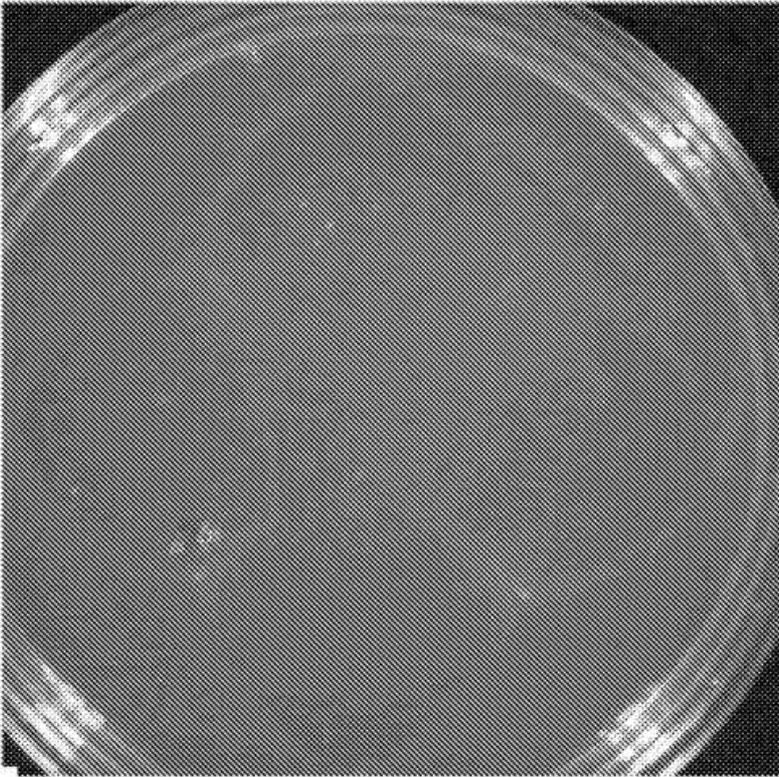


Imagen de "liberación"

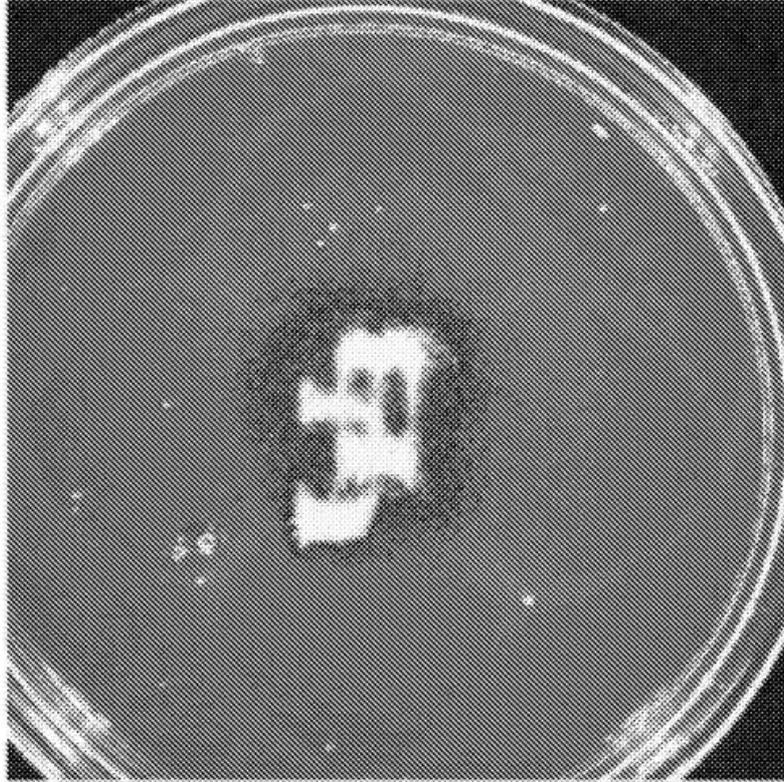


Figura 12

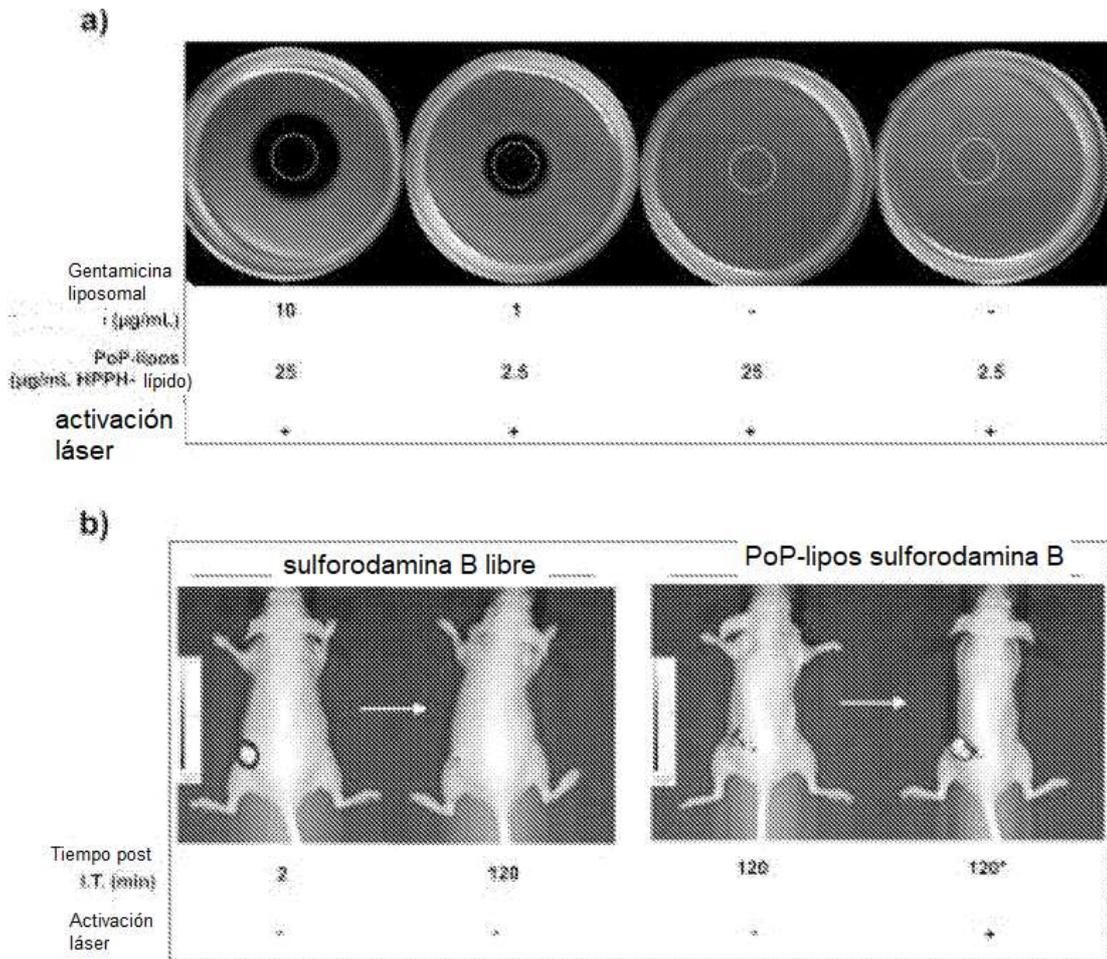


Figura 13

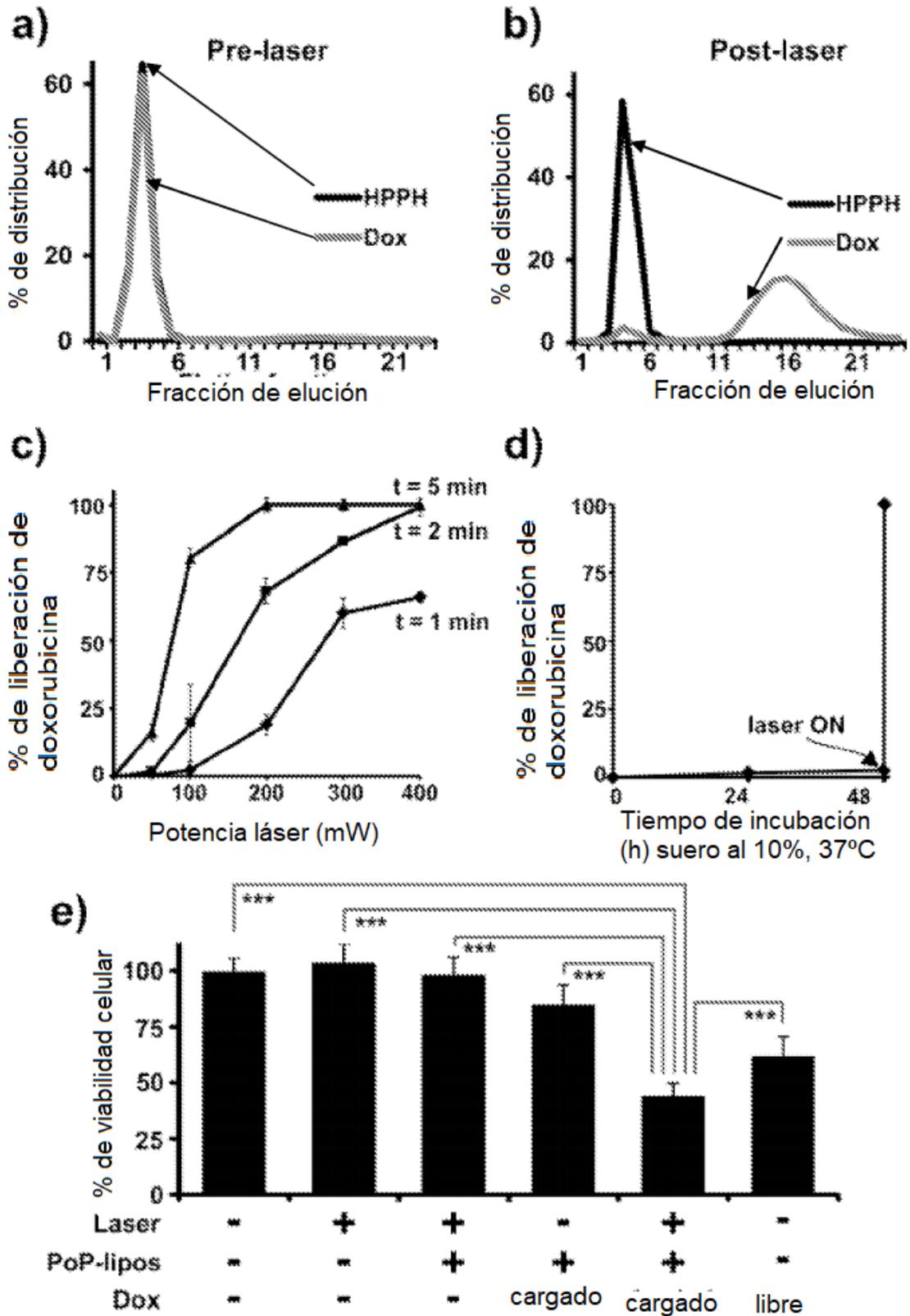


Figura 14

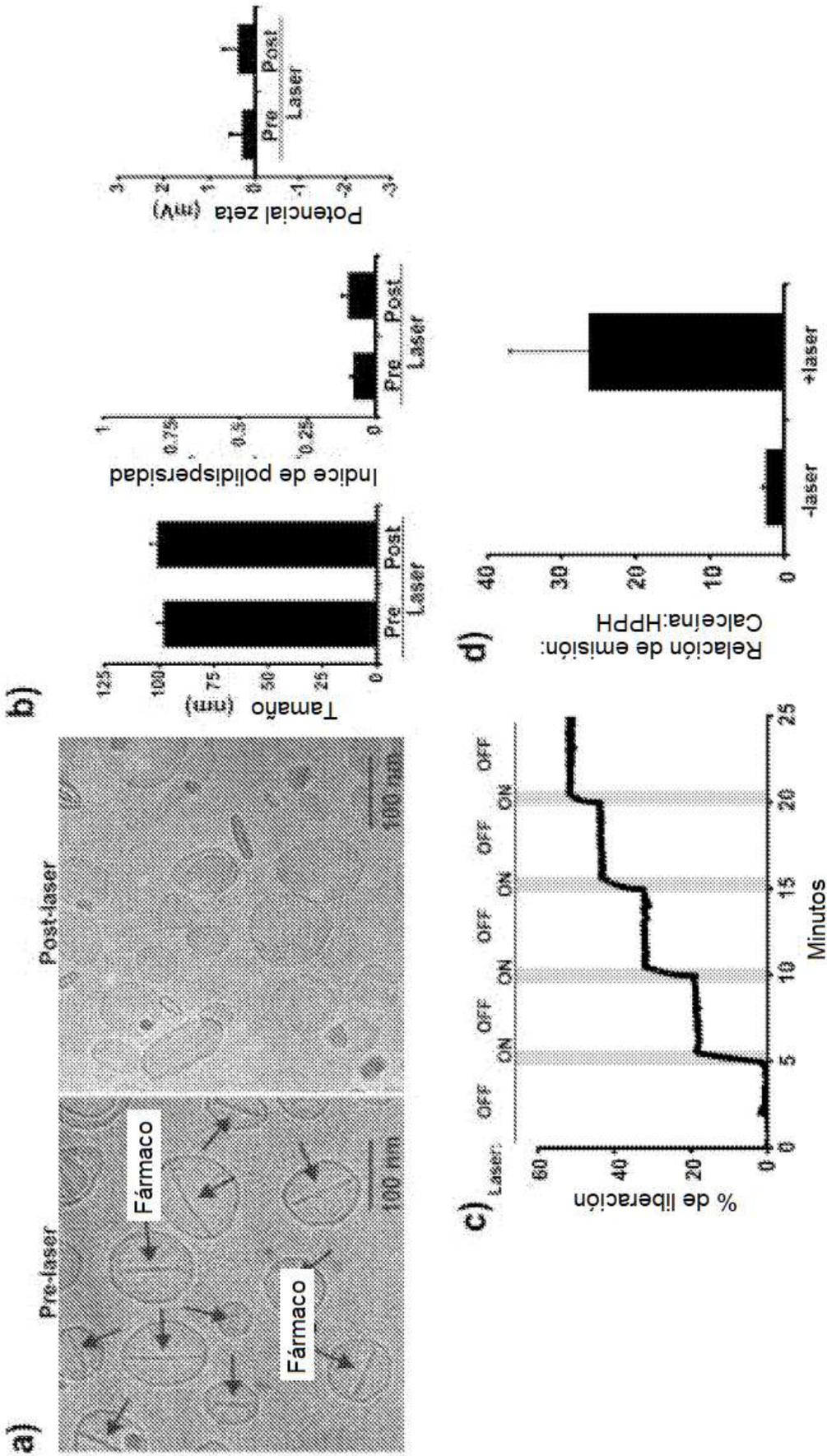


Figura 15

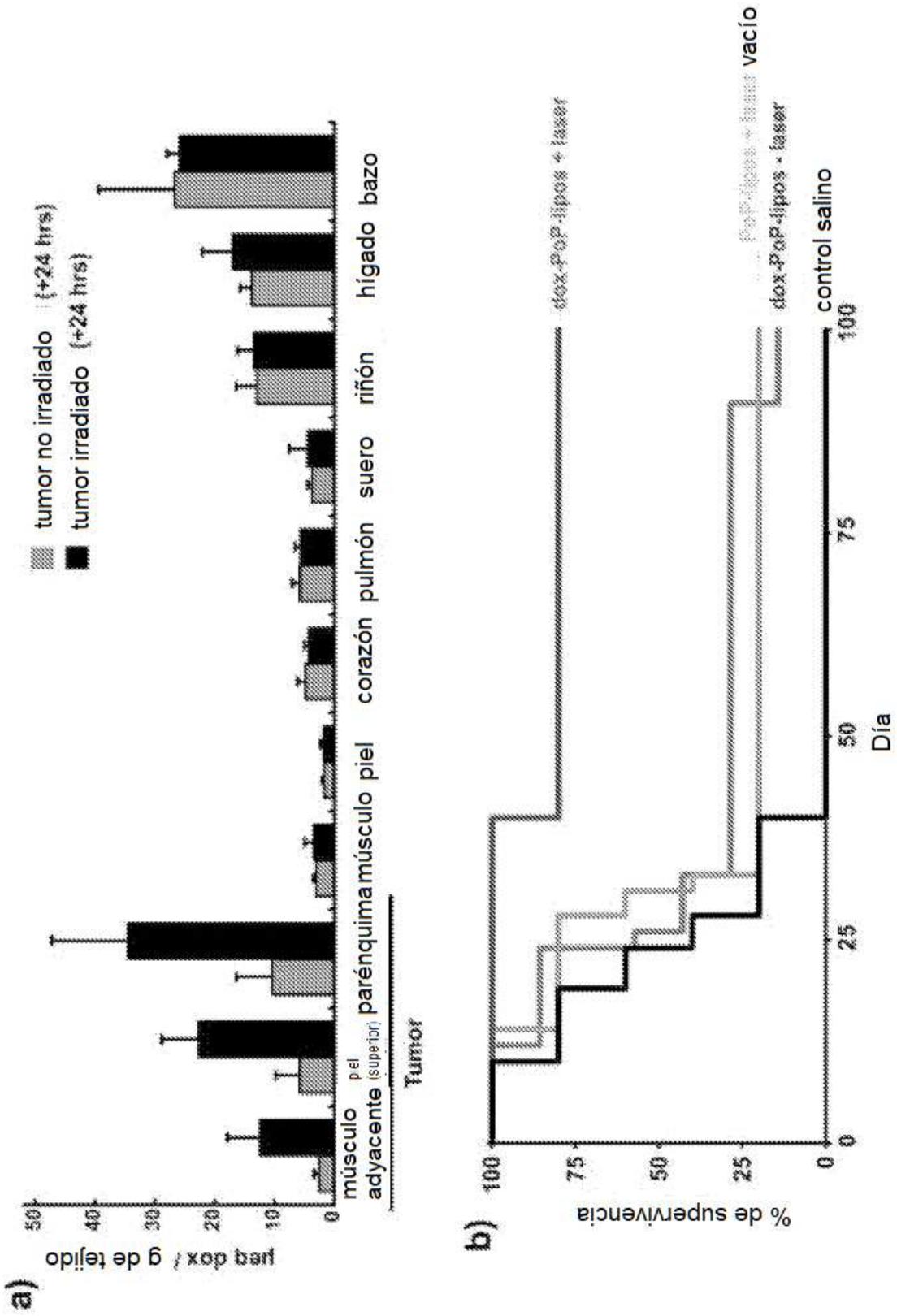


Figura 16

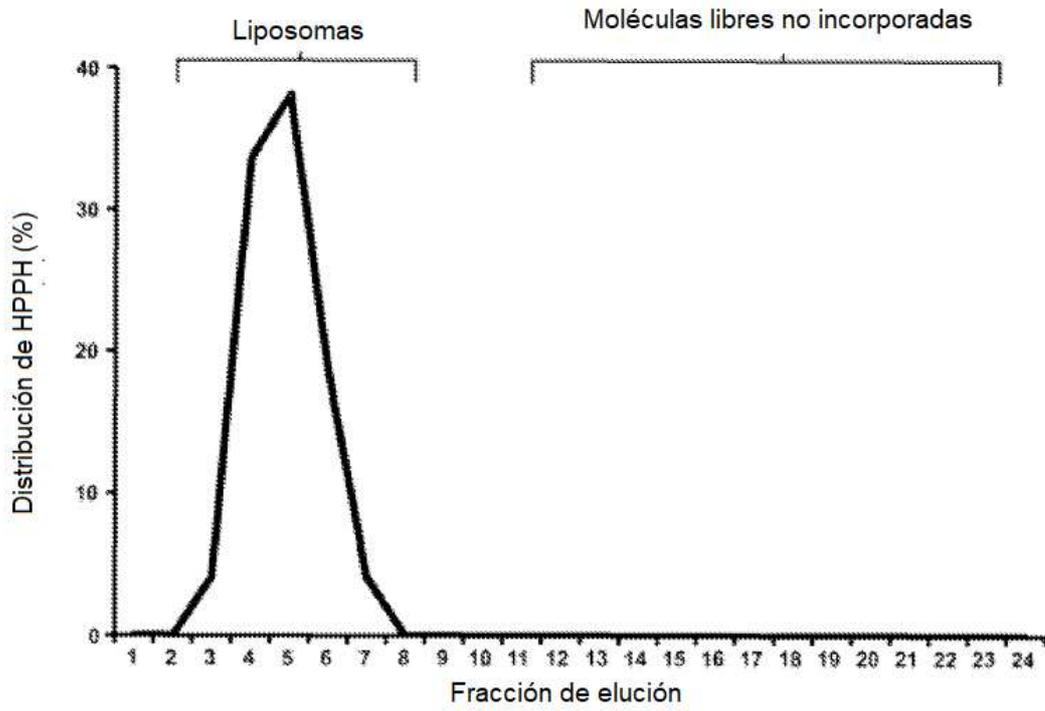


Figura 17

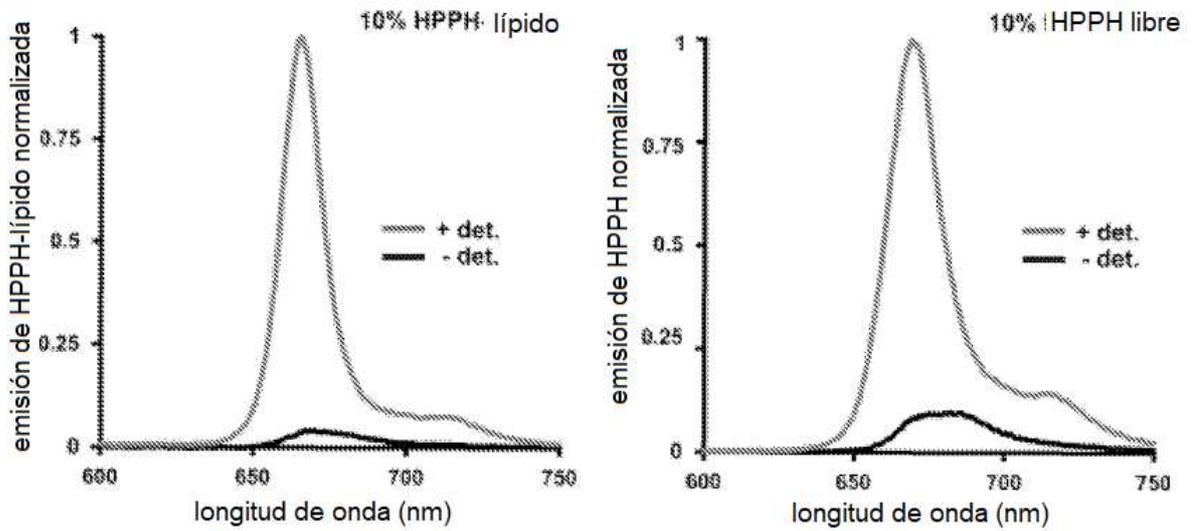


Figura 18

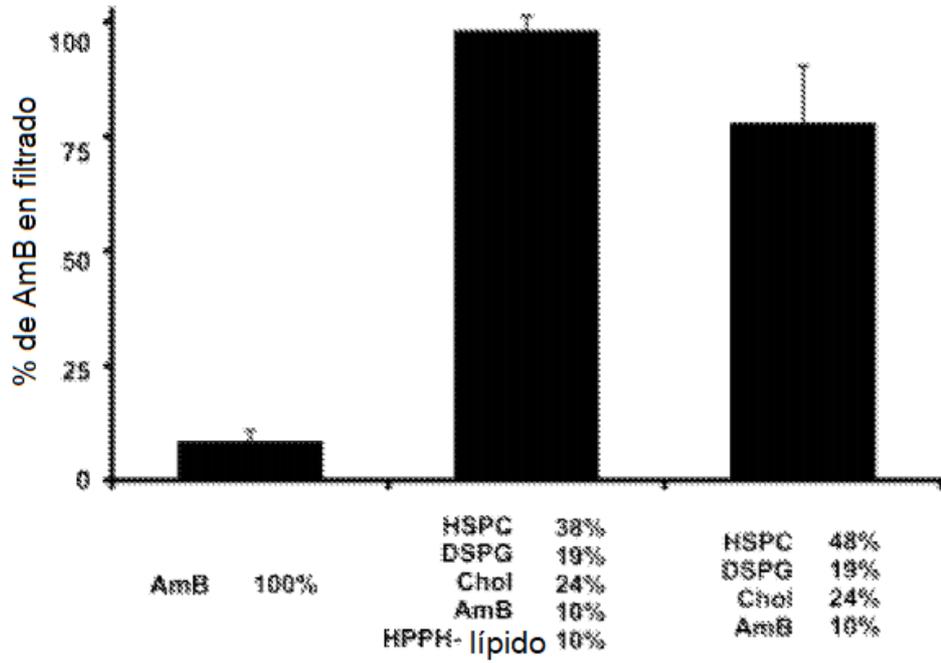


Figura 19

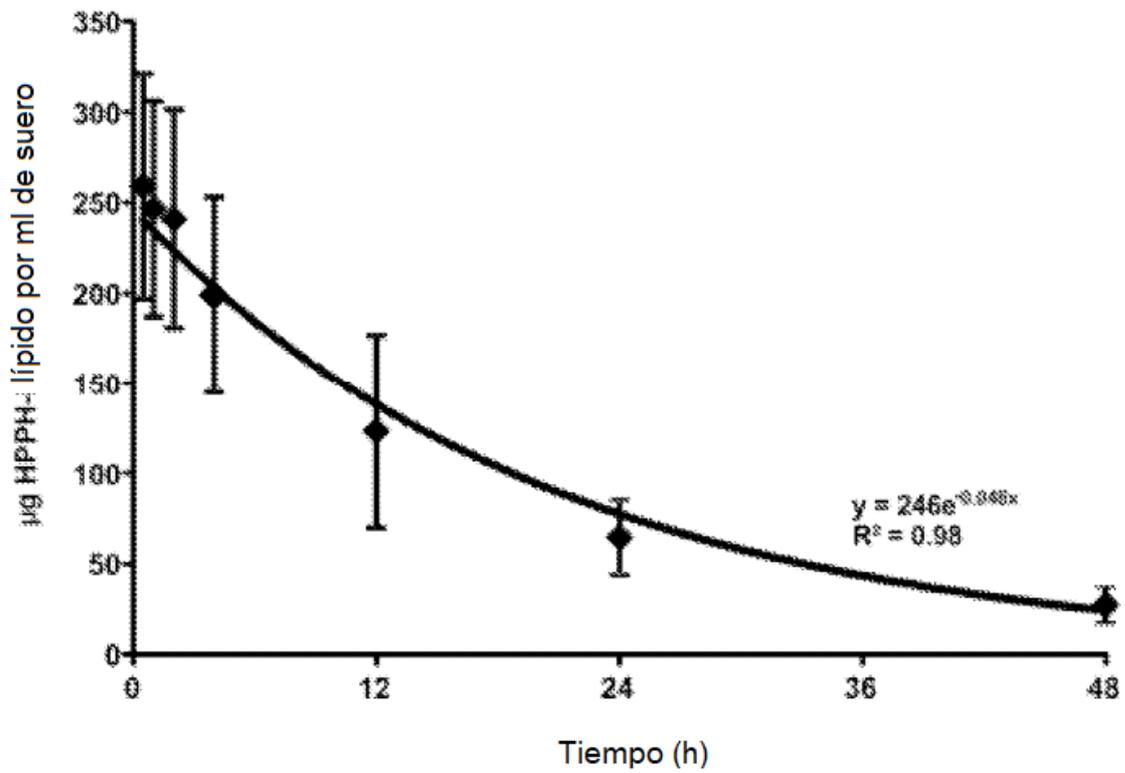


Figura 20

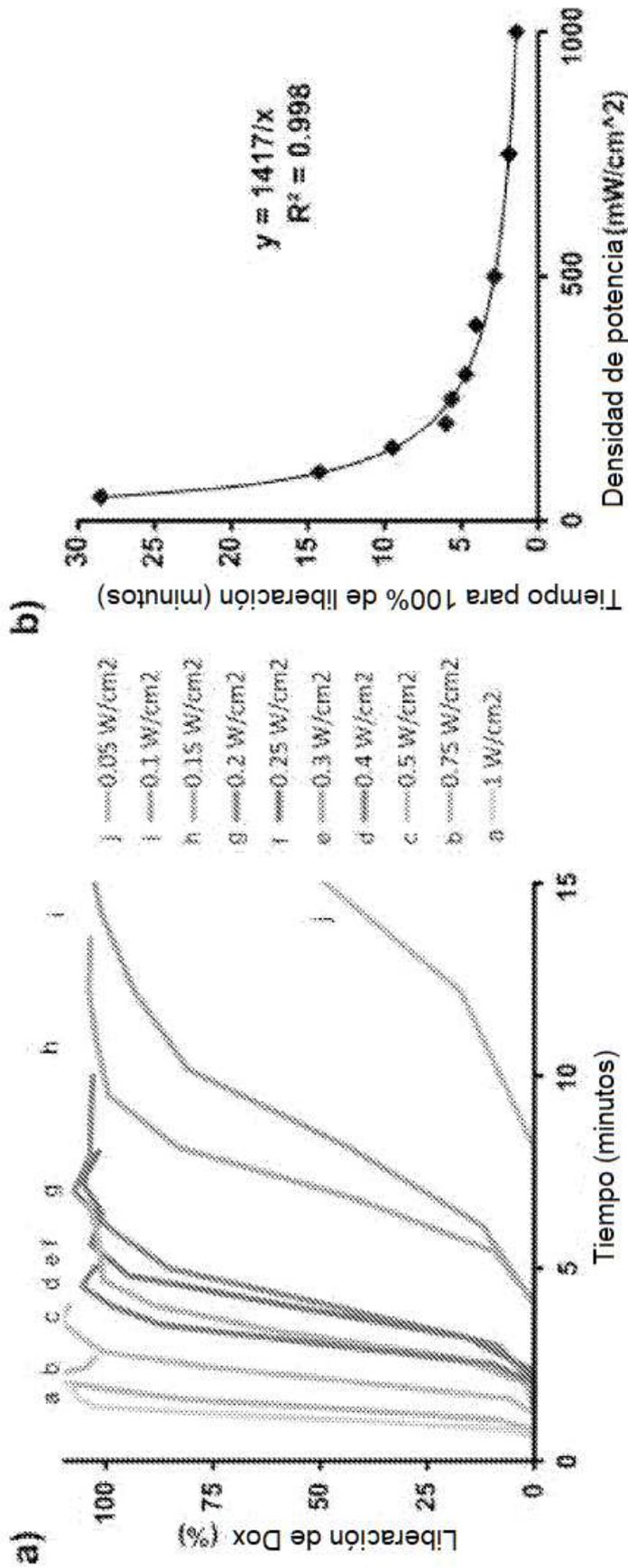


Figura 21

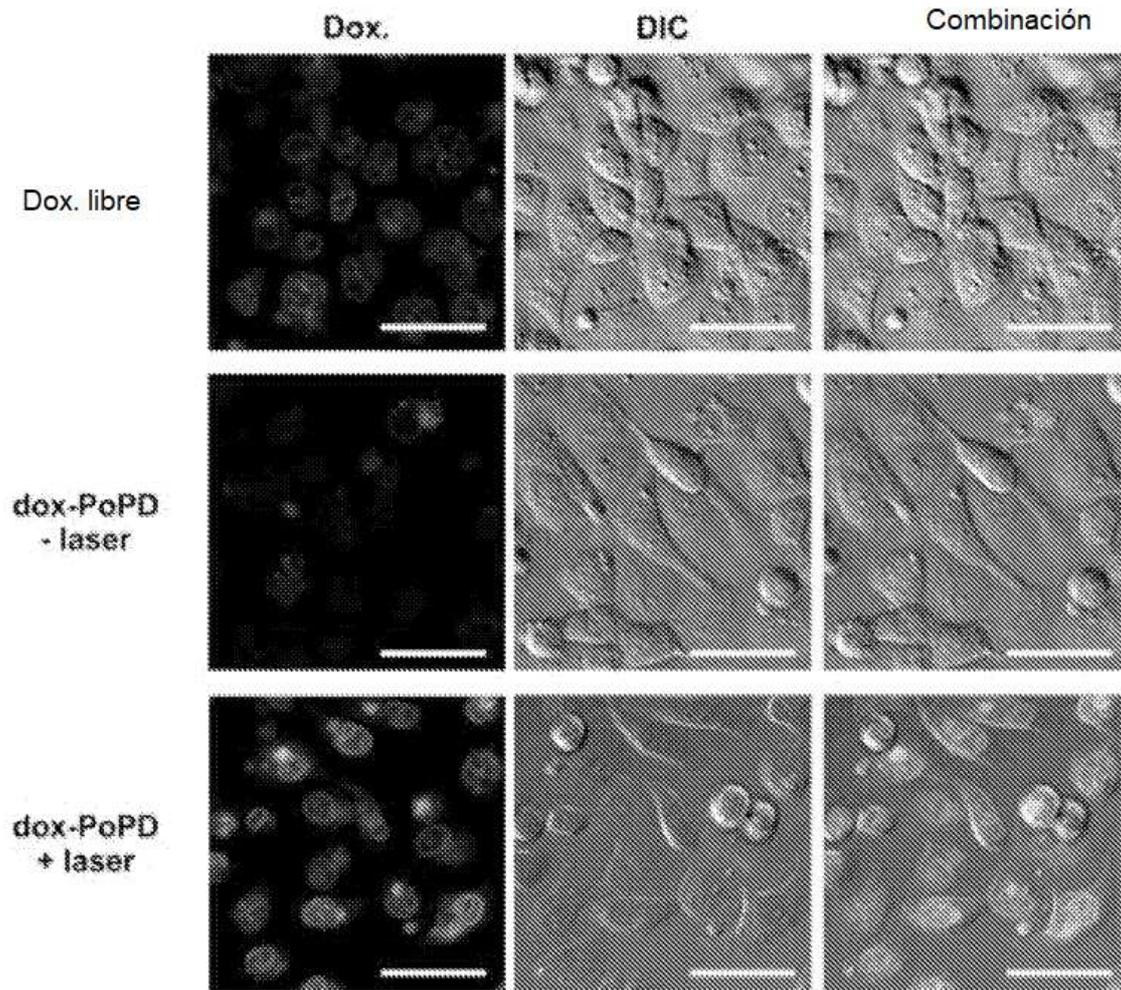


Figura 22