



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

**ESPAÑA** 



① Número de publicación: 2 773 763

(51) Int. CI.:

A61K 9/127 (2006.01) A61K 47/10 (2007.01) A61K 47/26 (2006.01) A61K 51/08 (2006.01) A61K 51/12 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

11.10.2016 PCT/EP2016/001680 (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional:

(87) Fecha y número de publicación internacional: 27.04.2017 WO17067640

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 11.10.2016 E 16791518 (0)

11.12.2019 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: EP 3364953

(54) Título: Formulación liposomal novedosa para la administración hepática oral de fármacos

(30) Prioridad:

21.10.2015 EP 15003010

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 14.07.2020

(73) Titular/es:

**UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)** Grabengasse 1 69117 Heidelberg, DE

(72) Inventor/es:

FRICKER, GERT; MIER, WALTER; HELM, FRIEDER; **UHL, PHILIPP y URBAN, STEPHAN** 

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P** 

## **DESCRIPCIÓN**

Formulación liposomal novedosa para la administración hepática oral de fármacos

5

10

15

25

30

35

40

45

La presente invención se refiere a composiciones liposomales, que comprenden liposomas que contienen lípidos de tetraéter (TEL), y que comprenden además el lipopéptido Myr-HBVpreS/2-48 (Myrcludex B) como parte de dichos liposomas, así como dichas composiciones liposomales para uso en la prevención o tratamiento de trastornos o enfermedades hepáticas, y/o para uso en el administración hepática oral de agentes terapéuticos y/o diagnósticos.

La administración oral de fármacos se considera la forma más ventajosa de aplicación, en particular para el tratamiento de enfermedades crónicas, que exigen la administración repetida y a largo plazo de fármacos. La vía oral ofrece una alta seguridad de los fármacos y es ampliamente aceptada entre los pacientes debido a su conveniencia. Además, la no esterilidad de las formas de fármacos orales reduce los costes de producción, almacenamiento y distribución, lo que podría contribuir a la mejora de la atención médica en los países del tercer mundo. Se estima que el 90% de todas las formulaciones de fármacos comercializadas son para uso oral.

Sin embargo, muchos fármacos, particularmente péptidos y otros fármacos macromoleculares, muestran una estabilidad muy pobre bajo las condiciones ácidas en el estómago después de la administración oral y también una mala absorción a través de la barrera gastrointestinal (Figs. 1 y 2). Para superar este problema, se han ensayado en los últimos años diferentes enfoques para mejorar la biodisponibilidad que incluyen nanopartículas lípidas sólidas, nano- o micro-emulsiones o liposomas. Sin embargo, las formulaciones liposomales convencionales no han sido muy convincentes debido a su inestabilidad en el tracto gastrointestinal (GIT).

Los documentos relevantes de la técnica anterior son: Zhang X. et al., "Hepatitis B virus preS1-derived lipopeptide functionalized liposomes for targeting of hepatic cells", Biomaterials, vol. 35, 2014, págs. 6130-6141; Parmentier J. et al., "Oral peptide delivery by tetraether lipid liposomes", Int. J. of Pharm., vol. 415, 2011, págs. 150-157; and US 2013/0251783 A1.

Se puede lograr una mejora significativa en los liposomas mediante la combinación de fosfolípidos convencionales (PL) y los llamados lípidos de tetraéter (TEL) (Fig. 3), lípidos específicos derivados de arquea, por ejemplo el arqueón extremófilo *Sulfolobus acidocaldarius*. Estudios recientes mostraron que estos TEL pueden mejorar la estabilidad liposómica en el GIT y también mediar en la penetración de la mucosa.

S. acidocaldarius crece a temperaturas entre 50 y 100 °C principalmente bajo condiciones ácidas, haciendo inevitable una membrana celular estable. Los lípidos de la membrana arqueal comprenden principalmente cadenas principales C<sub>20</sub>-C<sub>40</sub> de subunidad isoprenoide, unidas por enlaces de éter a glicerol y/o grupo(s) puente(s) de nonitol. El grupo puente no está sustituido o está sustituido con uno de una amplia variedad de grupos de cabeza polar o no polar. La cantidad de estos restos en la membrana celular de la arquea difiere con las condiciones de crecimiento y aumenta con la temperatura ambiental. Los TEL glicerilcalditiltetraéter (GCTE) y digliceriltetraéter (DGTE) con un número promedio de cuatro a seis anillos de ciclopentilo pueden aislarse de S. acidocaldarius.

Las enfermedades hepáticas, como la hepatitis viral, la hepatitis autoinmune, la hemocromatosis hereditaria, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la enfermedad de Wilson, se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Los factores de riesgo adicionales son las toxinas, como el alcohol y la aflatoxina. Si bien la prevalencia de la hepatitis autoinmune y los trastornos metabólicos, como la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson, es muy baja, más de 500 millones de personas en todo el mundo están continuamente infectadas con el virus de la hepatitis B y/o hepatitis C. Hasta un millón de personas mueren anualmente debido a infecciones de hepatitis B (VHB) y sus consecuencias. Como la enfermedad solo se asocia con síntomas inespecíficos (los más comunes son malestar general y fatiga), aumenta el riesgo de desarrollar cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular. Se estima que el 57% de la cirrosis hepática total y el 78% de los carcinomas hepatocelulares primarios son el resultado de infecciones por hepatitis B/hepatitis C (VHC). La infección aguda por VHB se trata sintomáticamente y, desafortunadamente, la infección crónica por VHB no es curable. Esto resalta la importancia de diagnosticar las infecciones de hepatitis en una etapa temprana para permitir un tratamiento óptimo.

En vista de lo anterior, el problema técnico que subyace a la presente invención es la provisión de medios para la administración hepática de fármacos por vía oral.

La solución al problema técnico anterior se logra mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

En particular, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición liposomal que comprende:

- 50 (a) liposomas que comprenden lípidos de tetraéter (TEL), y
  - (b) el lipopéptido Myr-HBVpreS/2-48 (Myrcludex B) como parte de dichos liposomas.

Como se usa en la presente memoria, el término "composición liposomal" se refiere a una composición que comprende liposomas. El término "liposoma", como se usa en la presente memoria, se refiere a vesículas preparadas artificialmente compuestas de bicapas lipídicas. Los liposomas pueden usarse para la administración de agentes

debido a su propiedad única de encapsular una región de disolución acuosa dentro de una membrana hidrófoba. Los solutos hidrófilos disueltos no pueden pasar fácilmente a través de la bicapa lipídica. Los compuestos hidrofóbicos pueden disolverse en la bicapa lipídica, y de esta manera los liposomas pueden transportar compuestos hidrofóbicos e hidrófilos. Para administrar las moléculas a los sitios de acción, la bicapa lipídica puede fusionarse con otras bicapas, como las membranas celulares, administrando así el contenido de los liposomas. Al hacer liposomas en una disolución de un agente, se puede administrar al lumen interno del liposoma.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Los TEL que pueden usarse para la formación de liposomas no están particularmente limitados y son conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, dichos TEL se derivan de una especie de arquea del género *Sulfolobus* por ejemplo *S. islandicus* o *S. acidocaldarius*, en donde este último es particularmente preferido. En una realización preferida, los TEL se seleccionan del grupo que consiste en glicerilcalditiltetraéter (GCTE), digliceriltetraéter (DGTE) y combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, los liposomas usados en las composiciones de la presente invención comprenden dichos TEL en una cantidad de más de 0% molar a 25% molar, preferiblemente 1 a 25% molar, más preferiblemente 1 a 10% molar, más preferiblemente 3 a 7% molar, más preferiblemente 4 a 6% molar basado en la cantidad total de lípidos. En realizaciones específicas, dichos liposomas comprenden dichos TEL en una cantidad de aproximadamente 5% en moles basado en la cantidad total de lípidos.

Además de la presencia de TEL como se describe anteriormente, los liposomas usados en las composiciones según la presente invención no están particularmente limitados a lípidos específicos. En particular, los lípidos usados para la generación de dichos liposomas pueden ser cualquier lípido adecuado conocido en la técnica. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, colesterol o derivados del mismo, fosfolípidos, lisofosfolípidos u otros tetraeterlípidos adicionales. Por consiguiente, en una realización preferida, dichos liposomas comprenden uno o más lípidos, seleccionados del grupo que consiste en colesterol y derivados del mismo, fosfolípidos, lisofosfolípidos y tetraeterlípidos. Preferiblemente, dichos liposomas comprenden fosfolípidos, en donde dichos fosfolípidos pueden ser fosfolípidos sintéticos, semisintéticos o naturales. En general, los lípidos adecuados pueden seleccionarse del grupo que consiste en fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilinositos, fosfatidilserinas, cefalinas, fosfatidilgliceroles y lisofosfolípidos. En una realización particular de la presente invención, los liposomas comprenden fosfatidilcolina de huevo (E-PC; lecitina) y colesterol, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 80 a 90% en moles, preferiblemente aproximadamente 85% en moles de E-PC y aproximadamente 5 a 15% en moles, preferiblemente aproximadamente 10% en moles de colesterol. Los liposomas a utilizar según la presente invención pueden comprender además cualquier agente adecuado adicional tal como por ejemplo inhibidores enzimáticos, potenciadores de permeación u otras sustancias lipófilas o hidrófilas que pueden usarse para la estabilización de los liposomas o para alterar las propiedades de los liposomas. Dichas sustancias lipófilas o hidrófilas no están particularmente limitadas y son conocidas en la técnica. Incluyen, por ejemplo, vitamina E, ácidos grasos, ceras y mono-, di- y triglicéridos. Además, se pueden añadir sustancias que mejoran la biodisponibilidad de los agentes activos encerrados, como inhibidores enzimáticos, moduladores de unión estrecha o agentes quelantes.

Los lípidos utilizados para la preparación de estos liposomas también pueden unirse a estructuras de búsqueda de dianas tales como secuencias de péptidos, anticuerpos, ligandos receptores y tensioactivos.

En una realización preferida, los liposomas comprendidos en la composición de la presente invención exhiben un promedio Z medido por dispersión de luz dinámica después de la dilución en medio acuoso de 350 nm como máximo y un índice de polidispersidad (PDI) de 0,3 como máximo, donde se prefiere particularmente un promedio Z de 100 a 250 nm y un índice de polidispersidad de como máximo 0,2.

Los métodos para la generación de liposomas no están particularmente limitados y son conocidos en la técnica. Incluyen, por ejemplo, homogeneización a alta presión, extrusión y centrifugación asimétrica dual (DAC).

Según la presente invención, las composiciones liposomales anteriores comprenden el lipopéptido Myr-HBVpreS/2-48 (Myrcludex B) como parte de los liposomas. En este contexto, el término "comprende el lipopéptido como parte de los liposomas" tal como se usa en la presente memoria se refiere al hecho de que dicho lipopéptido está presente en el lumen interno de los liposomas y/o está incorporado en la bicapa lipídica liposomal. En este contexto, Myrcludex B puede incorporarse a la bicapa lipídica a través de su cadena de ácido graso.

Myrcludex B es un péptido lineal que consta de 47 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 2 a 48 de la proteína preS virus de la hepatitis В (VHB) (SEQ ID NO: GQNLSTSNPLGFFPDHQLDPAFRANTANPDWDFNPNKDTWPDANKVG) con una miristoilación en el extremo Nterminal, con un peso molecular de 5366 g/mol. Es un fármaco en investigación para el tratamiento de la hepatitis B. Sin embargo, como fármaco macromolecular, Myrcludex B muestra por sí mismo una pobre biodisponibilidad oral (<1%), de modo que hasta ahora solo es posible la aplicación subcutánea, lo que resulta en un bajo cumplimiento del paciente y altos costes médicos. Sin embargo, cuando se usa en las composiciones liposomales de la presente invención, la biodisponibilidad oral y la administración hepática de Myrcludex B pueden aumentar significativamente. Por lo tanto, las composiciones liposomales de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de la hepatitis B.

Además, en la presente invención, se ha identificado que Myrcludex B muestra hepatotropismo pronunciado, es decir, una alta acumulación selectiva en el tejido hepático. Por lo tanto, las composiciones liposomales de la presente invención pueden usarse como un sistema de administración de fármacos administrado por vía oral que exhibe una alta eficacia de focalización hepática.

5 Según este aspecto de la presente invención, las composiciones liposomales de la presente invención pueden comprender además al menos un agente terapéutico adicional y/o al menos un agente de diagnóstico.

10

50

Los agentes terapéuticos respectivos no están particularmente limitados e incluyen cualquier agente para el cual una administración oral dirigida al hígado podría ser relevante. En realizaciones preferidas, el al menos un agente terapéutico adicional anterior se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de proteína quinasa, por ejemplo sorafenib, agentes citostáticos, por ejemplo cisplatino o doxorrubicina y antibióticos.

Además, los respectivos agentes de diagnóstico no están particularmente limitados e incluyen cualquier agente para el cual una administración oral dirigida al hígado podría ser relevante. En realizaciones preferidas, el al menos un agente de diagnóstico anterior se selecciona del grupo que consiste en agentes para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular (CHC).

Los agentes anteriores pueden estar presentes en las composiciones liposomales de la presente invención encerradas en los liposomas, es decir, en el lumen interno de dichos liposomas, por ejemplo cuando dichos agentes son hidrófilos o están integrados en la membrana liposómica, por ejemplo cuando dichos agentes son lipófilos. Además, dichos agentes pueden no estar asociados con Myrcludex B, o pueden estar asociados con Myrcludex B por interacciones no covalentes, o pueden estar unidos covalentemente a Myrcludex B. En este contexto, la encapsulación de agentes terapéuticos y/o diagnósticos depende de hidrofilia de dichos agentes y el método de preparación de liposomas.

En una realización preferida, el contenido de agente terapéutico y/o de diagnóstico en las composiciones liposomales según la presente invención está por encima del 0% en moles y como máximo del 50% en moles con respecto a la cantidad de agente utilizada.

Según el aspecto anterior, las composiciones liposomales de la presente invención pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno o enfermedad hepática en un sujeto.

Los trastornos y enfermedades hepáticas que pueden tratarse a este respecto no están particularmente limitados y son conocidos en la técnica. Incluyen preferiblemente trastornos o enfermedades hepáticas que se seleccionan del grupo que consiste en hepatitis viral, hepatitis autoinmune, hemocromatosis hereditaria, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad de Wilson, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular.

30 Preferiblemente, las composiciones liposomales para uso de la presente invención son para administración oral.

Estudios recientes mostraron que el pretratamiento con el inhibidor de la bomba de protones omeprazol disminuye la difusión de protones en los liposomas y, como consecuencia, disminuye la desnaturalización de los agentes encapsulados como las proteínas al elevar el pH en el estómago.

Por consiguiente, en una realización preferida de las composiciones liposomales para uso según la presente invención, el sujeto se trata previamente con un inhibidor de la bomba de protones, en donde dicho inhibidor de la bomba de protones es preferiblemente omeprazol (6-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metanosulfinil]-1*H*-1,3-benzodiazol), pantoprazol ((*RS*)-6-(difluorometoxi)-2-[(3,4-dimetoxipiridin-2-il)metilsulfinil]-1*H*-benzo[d]imidazol), esomeprazol ((*S*)-5-metoxi-2-[(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metilsulfinil]-3*H*-benzoimidazol), lansoprazol ((*RS*)-2-([3-metil-4-(2,2,2-trifluoroetoxi)piridin-2-il]metilsulfinil)-1*H*-benzo[d]imidazol) y/o rabeprazol ((*RS*)-2-([4-(3-metoxipropoxi)-3-metilpiridin-2-il]metilsulfinil)-1*H*-benzo[*d*] imidazol).

Ventajosamente, las composiciones liposomales de la presente invención pueden liofilizarse, por ejemplo usando sacarosa de 300 a 500 mM como un lioprotector, que permite el almacenamiento a largo plazo de dichas composiciones.

En un segundo aspecto relacionado, la presente invención se refiere al uso de una composición liposomal de la presente invención para la administración hepática oral de al menos un agente terapéutico y/o al menos un agente de diagnóstico.

En este contexto, el término "administración hepática oral" se refiere a la administración de uno o más agentes al tejido hepático mediante la administración oral de dichos agentes.

En este aspecto, todas las limitaciones y definiciones relevantes proporcionadas para el primer aspecto de la presente invención se aplican de manera análoga. En particular, las composiciones liposomales, los agentes terapéuticos y los agentes de diagnóstico son como se definieron anteriormente.

En un aspecto relacionado adicional, la presente invención se refiere a una composición liposomal para uso en un método para prevenir o tratar un trastorno o enfermedad hepática en un sujeto, que comprende la etapa de administrar, preferiblemente administrar oralmente, una composición liposomal de la presente invención a dicho sujeto.

En todavía un aspecto relacionado adicional, la presente invención se refiere a una composición liposomal para uso en la administración de al menos un agente terapéutico y/o al menos un agente de diagnóstico al hígado de un sujeto, que comprende la etapa de administrar, preferiblemente administrar oralmente, un composición liposomal de la presente invención a dicho sujeto.

5 En estos dos aspectos, todas las limitaciones y definiciones relevantes proporcionadas para el primer aspecto de la presente invención se aplican de manera análoga. En particular, las composiciones liposomales, agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y trastornos o enfermedades hepáticas son como se definieron anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" pretende ser un modificador de ± 10% del valor especificado. Como ejemplo, el término "aproximadamente 5%" pretende abarcar el intervalo de 4,5 a 5,5%.

Los términos "que comprende/comprende", "que consiste en/consiste en" y "que consiste esencialmente en/consiste esencialmente en" se usan en la presente memoria de manera intercambiable, es decir, cada uno de dichos términos se puede intercambiar expresamente por uno de los otros dos términos.

Las figuras muestran:

#### Figura 1:

15 Los fármacos de péptidos y otros productos biológicos muestran una pobre disponibilidad oral con un tamaño creciente.

#### Figura 2:

La degradación en el estómago y la pobre penetración de la mucosa son los principales obstáculos que impiden la disponibilidad oral de productos biológicos. Usando liposomas TEL, se pueden superar ambos obstáculos.

### 20 Figura 3:

Comparación de lípidos estándar (lecitina; enlaces éster) y TEL (enlaces éter).

#### Figura 4:

Comparación del tamaño liposomal (A) y el PDI (B) antes/después de la liofilización utilizando 100-500 mmol de sacarosa como lioprotector. Para esta formulación, la concentración más baja posible de sacarosa es 300 mmol.

# 25 Figura 5:

Niveles sanguíneos determinados del grupo control (línea discontinua) y del grupo de liposomas TEL (línea completa).

## Figura 6:

Enriquecimiento de diferentes formulaciones de Myrcludex B en tejido hepático [%ID/g] y [%/ID] después de la administración oral.

### 30 Figura 7:

Distribución de Myrcludex B en ratas Wistar después de 5 h; dosis inyectada: 500 µl del péptido libre marcado.

# Figura 8:

Distribución de Myrcludex B en ratas Wistar después de 5 h; dosis inyectada: 500 µl de la formulación liposomal estándar.

### 35 Figura 9:

Distribución de Myrcludex B en ratas Wistar después de 5 h; dosis inyectada: 500 µl de la formulación liposomal de TEL.

# Figura 10:

(A) imágenes PET de <sup>68</sup>Ga marcado con Myrcludex B (liposomal i.v.) 0-2 h después de la administración. (B) y (C) imágenes PET de <sup>124</sup>I marcado con Myrcludex B (liposomal oral) 0-24 h después de la administración.

## Figura 11:

Gráfica del tamaño liposomal y PDI frente a varias proporciones de colesterol (medias ± SD; n ≥ 3).

### Figura 12:

Gráfica del tamaño liposomal y PDI frente a varias proporciones de GCTE (medias ± SD; n ≥ 3).

#### Figura 13:

Análisis LC/MS de a) Myrcludex B y b) el derivado modificado de tirosina.

#### Figura 14:

Micrografías de crioelectrones que muestran la estructura laminar de (a) liposomas estándar de Myrcludex B y (b) liposomas de GCTE de Myrcludex B. Las micrografías muestran liposomas monolamelares y oligolamelares. Al comparar ambas formulaciones, no se pudo observar ninguna diferencia en la lamelaridad liposomal.

#### Figura 15

Comparación del tamaño liposomal y PDI antes/después de la liofilización utilizando trehalosa como lioprotector en varias relaciones molares (medias ± SD; n ≥ 3).

#### Figura 16:

Comparación del tamaño liposomal/PDI antes/después de la liofilización utilizando sacarosa como lioprotector para liposomas de GCTE en varias relaciones (medias ± SD; n> 5). Las concentraciones ≥ 300 mmol proporcionaron resultados prometedores.

#### 15 Figura 17:

20

25

Absorción de Myrcludex B en tejido hepático (media ± SD; n = 6) 3 h después de la administración oral. Ambas formulaciones liposomales de GCTE condujeron a un aumento significativo en la absorción de Myrcludex B. En contraste, al comparar los grupos liposomales de GCTE, el pretratamiento con omeprazol (omep.) No mostró diferencias significativas en la absorción de Myrcludex B. Los grupos de control (péptido libre) y tratamiento se compararon mediante el ensayo ANOVA de un factor y se consideraron significativos a \*p <0,05, \*\*p <0,01 y \*\*\*p <0,001.

#### Figura 18:

Absorción de Myrcludex B en el tejido hepático (media ± SD; n = 3) 3 h después de la administración oral utilizando diversas concentraciones de GCTE. En contraste con la formulación de 1% en moles de liposomal de GCTE, las otras dos formulaciones (5% en moles y 10% en moles) mostraron un aumento significativo en la absorción de Myrcludex B en comparación con los liposomas estándar. Los grupos de control (liposomas estándar) y tratamiento se compararon mediante el ensayo ANOVA de un factor y se consideraron significativos a \*p <0,05, \*\*p <0,01 y \*\*\*p <0,001.

### Figura 19:

Comparación del enriquecimiento de Myrcludex B en el hígado 3 h después de la administración oral de liposomas de GCTE y liposomas de GCTE que contienen adicionalmente 1% en moles y 10% en moles del cloruro de cetilpiridinio biopotenciador (significa ± SD; n = 3).

# Figura 20:

Cuantificación de Myrcludex B radiomarcado en muestras de sangre. Concentración del péptido libre y el péptido incorporado en liposomas estándar y GCTE (medias ± SD; n = 3) 0-6 h después de la administración oral.

35 La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos sin limitarse a los mismos.

## **Ejemplos**

Material y métodos:

Materiales.

Se obtuvo la lecitina (EPC) de AppliChem GmbH (Darmstadt, Alemania); se aislaron lípidos de tetraéter de *S. acidocaldarius* (DSM No. 639; ATCC n.º 33909) como se conoce en la técnica; se compraron perlas de vidrio (0,75-1,0 mm) de Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Alemania); las columnas NAP™-5 se obtuvieron de GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido); el Antra MUPS® (omeprazol) se adquirió de Astra Zeneca GmbH (Wedel, Alemania); se obtuvo gel de sílice 60 (0,063-0,200 mm) de Merck (Darmstadt, Alemania); se obtuvo radioyodo de Perkin Elmer® (Boston, EE. UU.), el Triton™ X-100, el colesterol y todos los disolventes se compraron de Sigma Aldrich (Taufkirchen, Alemania).

Aislamiento y purificación de GCTE y DGTE.

El crecimiento celular y la extracción de lípidos se realizaron como se conoce en la técnica. Se separó *S. acidocaldarius* del medio y se liofilizó usando un Delta 1-20 KD de Martin Christ (Osterode, Alemania). Los lípidos se aislaron mediante extracción Soxhlet con cloroformo/metanol (2:1 v/v) como se conoce en la técnica. El disolvente extraído se eliminó por evaporación rotatoria. Posteriormente, la mezcla de lípidos se disolvió en una mezcla de cloroformo, metanol y ácido clorhídrico (8:3:1 v/v). La mezcla se calentó durante 3 días a 60 °C para escindir los grupos de cabeza lipídicos.

Finalmente, los lípidos se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1) de la fase acuosa. El GCTE se separó por cromatografía en columna de gel de sílice con agua/metanol (1:1 v/v) como primer eluyente (para prelavar la columna), seguido de agua/metanol/cloroformo (1:2,5:1 v/v) para eliminar los lípidos no deseados, y metanol/cloroformo (1:1 v/v) para obtener la fracción GCTE.

10 Síntesis de péptidos y radiomarcaje - Síntesis de Myrcludex B y Myrcludex B modificado con tirosina.

Ambos péptidos se fabricaron mediante síntesis en fase sólida usando la química fluorenilmetoxicarbonilo/terc-butilo (Fmoc/tBu) en un sintetizador de péptidos 433A de Applied Biosystems como se conoce en la técnica. El análogo de tirosina (la tirosina se encuentra en el C-terminal del péptido) se produjo para radiomarcaje por yodo para ensayos en animales como se describe a continuación, mientras que para todos los demás ensayos, se utilizó Myrcludex B.

15 Síntesis de péptidos y radiomarcaje - Radiomarcaje de Myrcludex B modificado con tirosina

Para el radiomarcaje del Myrcludex B modificado con tirosina, se preparó una disolución madre 1 mM en agua/dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad requerida de yodo radiactivo-131 ( $^{131}$ I) se añadió a una mezcla 1:1 de 25  $\mu$ I de la disolución madre y 25  $\mu$ I de un tampón fosfato 0,25 M de pH 7,5. El marcaje se realizó usando el método de cloramina T conocido en la técnica. La mezcla de reacción se purificó por HPLC semi preparativa como se conoce en la técnica. Posteriormente, la pureza del compuesto radiomarcado se determinó por radio-HPLC (Agilent 1100 Series) usando una columna Chromolith® Performance RP-18e, 100-3 mm aplicando un gradiente lineal de 0,1% TFA en agua (eluyente A) a 0,1% TFA en acetonitrilo (eluyente B) en 5 min; velocidad de flujo 2 ml/min; Absorbancia UV  $\lambda$  = 214 nm; detección de  $\gamma$ .

Análisis de lípidos.

5

20

Se adquirió un espectro <sup>1</sup>H-NMR de TEL utilizando un sistema Avance II 400 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Alemania). Se adquirió un espectro IR utilizando un espectrómetro Nicolet Avatar 320 FT-IR (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Alemania). La espectrometría de masas se realizó con un sistema TSQ 700 (Thermo Finnigan MAT, Bremen, Alemania).

Liposomas - Composición lipídica de los liposomas.

- Para todos los experimentos, se examinaron dos formulaciones liposomales diferentes. Los liposomas que contienen GCTE (85% en moles de EPC, 10% en moles de colesterol y 5% en moles de GCTE) se compararon con los liposomas estándar (90% en moles de EPC, 10% en moles de colesterol). La formulación más prometedora de liposomal de GCTE con respecto al tamaño y PDI se determinó mediante la preparación de liposomas usando varias cantidades de EPC, colesterol y GCTE (véase el Ejemplo 3, *infra*).
- 35 Preparación de liposomas.

Se usó una composición de película lipídica que contenía 85% en moles de lecitina, 10% en moles de colesterol y 5% en moles de GCTE. Todos los lípidos se disolvieron en cloroformo/metanol 9:1 (v/v). Todas las formulaciones liposomales se prepararon mediante el método de película conocido en la técnica usando la tecnología DAC como se conoce en la técnica, esta última usando un SpeedMixer<sup>TM</sup> (DAC150FVZ Hauschild Engineering GmbH & Co. KG,

- 40 Hamm, Alemania). En primer lugar, los lípidos se disolvieron en cloroformo/metanol 9:1 (v/v) para obtener disoluciones madre de 100 mmol mientras que Myrcludex B se disolvió en cloroformo/metanol 1:1 (v/v; 1 mmol de stock). Se añadieron 25 μl de la disolución madre de Myrcludex B a la mezcla de lípidos; después, la disolución se secó con nitrógeno líquido. La película lipídica resultante se secó durante 1 h en una cámara de vacío. Después se añadieron 20 mg de perlas de vidrio. Los liposomas se prepararon mezclando rápidamente en 3 etapas a 3540 rpm en una
- centrífuga doble asimétrica usando un soporte de vial especial como se conoce en la técnica. Se realizaron tres ejecuciones y se añadieron diferentes cantidades de PBS (véase la Tabla 1, a continuación).

Tabla 1: Ajustes característicos del proceso de mezcla rápida.

	Rotación en el mezclador rápido [min]	Cálculo de volumen	Volumen añadido de PBS [μΙ]
Ejecución 1	30 min	Masa lipídica global (mg) × 1,5	28,4
Ejecución 2	5 min	Masa lipídica global (mg) × 2,5	47,3
Ejecución 3	1 min	Volumen total - 1. volumen - 2. volumen	127,0

Liposomas - Eficiencia de encapsulación.

5

10

15

30

35

40

La eficiencia de encapsulación de Myrcludex B se determinó por HPLC de fase inversa (Agilent 1100 Series) usando una columna C18 (Chromolith® Performance RP-18e, 100-3 mm) aplicando un gradiente lineal de TFA 0,1% en agua (eluyente A) a TFA 0,1% en acetonitrilo (eluyente B) en 5 min (velocidad de flujo de 2 ml/min; absorbancia UV  $\lambda$  = 214 nm). Después del proceso de mezcla rápida, los liposomas se dividieron en dos partes con 100  $\mu$ l cada una. La parte 1 se usó para calcular el valor del 100% obtenido destruyendo los liposomas mediante la adición de 50  $\mu$ l de Triton<sup>TM</sup> X-100 al 1% y determinando el área bajo la curva (AUC) de Myrcludex B por HPLC. La parte 2 se purificó mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G-25 (columnas NAP<sup>TM</sup>-5) y se cuantificó como parte 1. Para determinar la pérdida potencial de lípidos en las columnas NAP<sup>TM</sup>-5 durante la purificación de la parte 2, la concentración del colesterol en la suspensión liposomal se midió directamente después del proceso de mezcla rápida y después de la purificación usando columnas NAP<sup>TM</sup>-5. Para ambas mediciones, los liposomas se disolvieron 1:10 (v/v) en metanol. El colesterol se cuantificó por HPLC aplicando un gradiente isocrático de acetonitrilo/metanol (80:20 v/v) en 15 minutos (velocidad de flujo 2 ml/min; absorbancia UV  $\lambda$  = 208 nm) en una columna RP-18. Se comparó la concentración de colesterol antes y después de la etapa de purificación y se determinó el factor de corrección C para incluir la pérdida de lípidos en las columnas NAP<sup>TM</sup>-5 en el cálculo de la eficiencia de encapsulación. La eficiencia de encapsulación E(%) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

# E(%) = ([AUC] Myrcludex B parte 2 / [AUC] Myrcludex B parte 1) × 100% × C

donde [AUC] Myrcludex B parte 2 es la concentración de Myrcludex B en la fracción liposomal purificada y [AUC] Myrcludex B parte 1 es la concentración de Myrcludex B en la suspensión liposomal. C es el factor de corrección considerando la pérdida de lípidos en las columnas NAP<sup>TM</sup>-5.

Análisis de liposomas - Caracterización de partículas; tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta.

El tamaño de partícula y el PDI de los liposomas se determinó usando un Zetasizer Nano ZS de Malvern™, mientras que la eficiencia de encapsulación de Myrcludex B se determinó por HPLC.

Más específicamente, el tamaño de partícula, el PDI y el potencial zeta de todas las formulaciones liposomales se determinaron a temperatura ambiente usando un Zetasizer Nano ZS de Malvern™ (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). El tamaño y el PDI se midieron después de la dilución a una concentración de lípidos de 0,076 mg/ml con un tampón fosfato 10 mM con un pH de 7,4 usando el modo automático. El potencial zeta se determinó después de la dilución a una concentración de lípidos de 0,95 mg/ml mediante un tampón fosfato 50 mM con un pH de 7,4. Los ajustes predeterminados del modo automático del Zetasizer Nano ZS de Malvern™ (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) fueron los siguientes: número de mediciones = 3; duración de la ejecución = 10 s; número de ejecuciones = 10; tiempo de equilibración = 60 s; índice de refracción del disolvente 1,330; índice de refracción de la cubeta de poliestireno 1,590; viscosidad = 0,8872 mPa s; temperatura = 25 °C; constante dieléctrica = 78,5 F/m; modo de retrodispersión (173°); selección automática de voltaje; ecuación de Smoluchowski.

Análisis de liposomas - Caracterización de partículas; Micrografías Cryo-EM.

Para determinar la estructura laminar de la formulación liposomal de GCTE, las muestras se diluyeron a una concentración de 10 mg de lípidos por ml. Las rejillas Quantifoil (2/2) se descargaron por luminiscencia durante 10 s en una mezcla de gases de H₂ y O₂. Se aplicaron 3 μl de muestras a la rejilla y se secaron a 4 °C y 100% de humedad durante 8-10 s en un Vitrobot™ FEI. Las rejillas se observaron en un microscopio Krios™ operado a 200 kV y temperatura de nitrógeno líquido. Las micrografías de la muestra liposomal de GCTE se tomaron con una ampliación de 64.000 × como se conoce en la técnica.

Liofilización de liposomas - Estabilidad de almacenamiento a largo plazo; Liofilización con sacarosa y trehalosa a diferentes relaciones molares.

Todas las formulaciones liposomales se liofilizaron en un Delta 1-20 KD de Christ. El secado principal se llevó a cabo a -20 °C durante dos días con un siguiente secado secundario a 0 °C durante al menos seis horas. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el uso de sacarosa 300-500 mM como lioprotector (Fig. 4 A, B).

5

10

25

30

Más específicamente, el secado principal se realizó a -20 °C durante 2 días seguido de un secado secundario a 0 °C durante al menos 6 h. La sacarosa o la trehalosa se usaron como lioprotectores en un intervalo de 100-500 mM como se conoce en la técnica. Brevemente, los liposomas se prepararon como se describe anteriormente y se añadió la cantidad requerida de sacarosa/trehalosa. La suspensión liposómica se dividió en partes alícuotas de 50 μl y se liofilizó. Para evaluar la calidad de los productos liofilizados, los liposomas se rehidrataron con 50 μl de PBS y se determinaron el tamaño y el PDI.

Liofilización de liposomas - Estabilidad de almacenamiento a largo plazo; Tasa de recuperación de Myrcludex B después de liofilizar y determinar la humedad residual.

Para determinar la tasa de recuperación de Myrcludex B intacto después del proceso de liofilización, se purificó una muestra de los liposomas rehidratados mediante cromatografía en columna Sephadex G-25 (columnas NAP™-5) y se diluyó 1:1 con Triton™ al 1% X-100. Se detectó Myrcludex B por HPLC utilizando una columna C18 (Chromolith® Performance RP-18e, 100-3 mm) y se comparó con el producto rehidratado no purificado (cálculo análogo a *Liposomas - Eficiencia de encapsulación*, supra). La humedad residual se determinó mediante un medidor de humedad (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Alemania) utilizando 100 mg de los liposomas liofilizados calentándolos hasta 120 °C en 90 s.

20 Estudios en animales - Prueba de estudio de concepto; Acumulación hepática de Myrcludex B usando diferentes formulaciones.

El estudio en animales se realizó según las autoridades locales utilizando ratas Wistar machos con un peso corporal de aproximadamente 250-270 g. En la prueba de estudio de concepto, un análogo modificado por tirosina del lipopéptido Myrcludex B se marcó con <sup>131</sup>I y se incorporó a los liposomas. La distribución de órganos 3 h después de la administración oral se midió por recuento directo de tejido hepático. En la primera parte del estudio, se formaron cuatro grupos (n = 6) de ratas Wistar. Mientras que tres grupos de ratas (péptido libre, liposomas estándar y liposomas de GCTE) se pretrataron con Antra MUPS<sup>TM</sup> (omeprazol) suspendido mediante sonda (10 mg por rata) el día antes del experimento, un grupo recibió liposomas de GCTE sin pretratamiento con omeprazol para examinar si el método de pretratamiento aumentará la disponibilidad oral de Myrcludex B. En la segunda parte del estudio, se formaron tres grupos de ratas Wistar (n = 3) y recibieron tres concentraciones diferentes de GCTE liposomal (véase la Tabla 2 a continuación) para evaluar la mejor composición liposomal de GCTE para la absorción oral de Myrcludex B.

Tabla 2: Composición lipídica de las tres formulaciones liposomales de GCTE diferentes

	EPC (% en moles)	Colesterol (% en moles)	GCTE (% en moles)
1 % mol liposomas de GCTE	89	10	1
5 % mol liposomas de GCTE	85	10	5
10 % mol liposomas de GCTE	80	10	10

Las ratas se mantuvieron sin comida durante 12 h antes del experimento pero con libre acceso al agua. La aplicación oral se realizó por sonda. En la primera parte del estudio, cada rata del grupo 1 obtuvo una dosis correspondiente a 0,5 Mega Becquerel (MBq) del péptido libre marcado (control negativo), mientras que cada rata del grupo 2 obtuvo una dosis correspondiente a 0,5 MBq de los liposomas estándar y cada rata de los grupos 3 y 4 obtuvieron una dosis correspondiente a 0,5 MBq de los liposomas de GCTE. En la segunda parte del estudio, cada rata del grupo 1 obtuvo una dosis correspondiente a 0,5 Mega Becquerel (MBq) de los liposomas de GCTE al 1% molar, mientras que cada rata del grupo 2 obtuvo una dosis correspondiente a 0,5 MBq de los liposomas de GCTE al 5% molar y cada rata del grupo 3 obtuvo una dosis correspondiente a 0,5 MBq de los liposomas de GCTE al 10% molar. Las ratas se sacrificaron después de 3 h, el tejido hepático se retiró y se pesó y la radioactividad se midió usando un contador Berthold LB 951 G en comparación con los estándares. La actividad asociada al hígado se relacionó con la dosis total inyectada (ID) y se expresó como un porcentaje de la dosis total inyectada por gramo de tejido (% ID/g).

45 Estudios en animales - Prueba de estudio de concepto; Estudio farmacocinético.

Para el estudio farmacocinético, se trataron 3 grupos de ratas Wistar (n = 3) como se describió anteriormente y se tomaron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 3 y 6 h después de la administración. La cantidad de radioactividad de las muestras de sangre se midió usando un contador Berthold LB 951 G.

Estudios en animales - Prueba de estudio de concepto; Análisis estadístico.

Los datos estadísticos se procesaron utilizando el software Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) Y se presentaron como media ± desviación estándar de la media (S.D.). Los grupos de control y tratamiento se compararon mediante el ensayo ANOVA de un factor utilizando el software Prism® y se consideraron significativos a \*p <0,05, \*\*p <0,01 y \*\*\*p <0,001.

Ejemplo 1:

#### 10 Estudio farmacocinético

El Myrcludex B ha sido etiquetado con <sup>125</sup>l y <sup>131</sup>l respectivamente para seguir su distribución de órganos después de la administración oral (estudio farmacocinético y de biodistribución) mediante recuento directo de homogenados de órganos y muestras de sangre.

El tamaño de estos liposomas (determinado por dispersión de luz dinámica en un Malvern Zetasizer) estaba en el intervalo de 150 a 170 nm. El uso de más del 10% en moles de TEL conduce a ambos, a un aumento en la distribución del tamaño de partícula y también a una disminución en la velocidad de incorporación.

En un primera prueba de estudio de concepto, los liposomas se administraron a ratas mediante sonda. De este modo, el lipopéptido modificado con tirosina Myrcludex B se marcó con <sup>131</sup>I con el fin de detectar el péptido, y se incorpora a los liposomas. Los animales recibieron el péptido libre o liposomas que contienen TEL (5% molar TEL). En comparación con el grupo de control (péptido libre), los niveles en sangre del grupo liposomal mostraron una tasa de recuento tres veces más alta que indica una absorción de Myrcludex B mucho mayor del grupo liposomal de TEL (Fig. 5).

# Ejemplo 2

20

40

45

El Myrcludex B marcado y los liposomas que los contienen se prepararon como en el Ejemplo 1.

- Para el estudio de biodistribución, se formaron tres grupos de ratas Wistar (tres ratas por grupo). Las ratas se mantuvieron sin comida durante 12 h pero con libre acceso al agua. Un día antes del experimento, las ratas se pretrataron con Antra MUPS (omeprazol) suspendido mediante sonda. La aplicación oral se realizó por sonda. Cada rata del grupo 1 obtuvo 500 μl del péptido libre marcado, mientras que cada rata del grupo 2 obtuvo 500 μl de la preparación liposomal estándar y cada rata del grupo 3 obtuvo 500 μl de la preparación liposomal de TEL.
- 30 El grupo de control en el que cada rata recibió 500 µl del péptido libre marcado mostró una absorción hepática de Myrcludex B de solo el 0,33% de la dosis inicial (ID)/g en comparación con los estándares (Fig. 7). El grupo 2 (en el que cada rata recibió una formulación liposomal convencional que consiste en el 85% de lecitina y el 15% de colesterol) mostró un aumento en la absorción hepática (0,56% ID/g) en comparación con los estándares (Fig. 8).
- En comparación con el grupo de liposomas estándar, el grupo que recibió liposomas de TEL mostró, con mucho, la mayor absorción hepática de Myrcludex B (1,14% ID/g) (Fig. 9). Debido al hecho de que, en general, el peso del hígado de las ratas Wistar es de aproximadamente 6 a 8 g, en total se pudo detectar una absorción hepática de aproximadamente 8 a 10% de la dosis inicial de Myrcludex B.
  - La Figura 6 muestra la comparación del enriquecimiento de Myrcludex B en el tejido hepático a)%ID/g y b)%ID 3h después de la administración oral. El grupo liposomal de TEL mostró la mayor absorción de Myrcludex B (1,14% ID/g) comparado con el 0,56% ID/g del grupo liposomal estándar y el 0,33% ID/g del grupo que obtuvo el péptido libre.

Para un nuevo enfoque de estudios de biodistribución, el péptido Myrcludex B se combinó con el agente quelante ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA). Esta combinación permitió una técnica de marcaje alternativa para Myrcludex B usando <sup>68</sup>Ga como radionúclido. <sup>68</sup>Ga (vida media = 68 min), como agente emisor de positrones, permitió el uso del moderno método de imagen molecular de tomografía por emisión de positrones (PET). Usando PET, se pudieron obtener imágenes de la biodistribución del péptido marcado administrado a las ratas (Fig. 10). Para obtener imágenes PET de Myrcludex B liposomal administrado por vía oral, el péptido se marcó mediante <sup>124</sup>I. Las imágenes PET de Myrcludex B liposomal administrado i.v. se obtuvieron por quelación con DOTA /<sup>68</sup>Ga.

Ejemplo 3

50 Determinación del tamaño de partícula y el PDI de diferentes formulaciones liposomales

Para determinar la mejor formulación liposomal con respecto al tamaño y PDI, los liposomas se prepararon usando diversas cantidades de los componentes liposomales EPC, colesterol y GCTE. Primero, se mezclaron diferentes

cantidades de colesterol con el EPC lipídico estándar. La adición de más del 10% en moles de colesterol dio como resultado un aumento moderado en el tamaño liposomal y PDI (Figura 11).

En la segunda etapa, se examinó la dependencia de la concentración de GCTE (0 - 25% en moles) usando x% en moles de EPC y 10% en moles de colesterol como mezcla de lípidos estándar para cada concentración de GCTE. La cantidad de EPC se calculó mediante la siguiente ecuación:

### EPC % mol = 100% mol - 10% mol colesterol - x% mol GCTE

con x% mol- GCTE = 0-25

Los resultados mostraron valores casi constantes del tamaño liposomal. Por el contrario, se pudo observar un aumento significativo en el PDI (Figura 12).

Para cumplir con el requisito de un tamaño liposomal pequeño acompañado de un PDI bajo, se consideró una mezcla de lípidos de 5% en moles de GCTE, 10% en moles de colesterol y 85% en moles de EPC la formulación liposomal ideal.

Ejemplo 4

5

Aislamiento de lípidos de tetraéter

- El procedimiento de aislamiento produjo los lípidos de tetraéter purificados con solo ligeras variaciones en el número de anillos de pentilo (3-5) en las cadenas lipófilas según lo determinado por espectrometría de masas y cromatografía en capa fina en comparación con los estándares. El número de anillos de pentilo está influenciado por la temperatura durante el cultivo de las arqueas. Se pueden obtener aproximadamente 1 g de lípidos de tetraéter por cada 400 g de masa celular húmeda.
- 20 Ejemplo 5:

Síntesis de péptidos y radiomarcaje

Síntesis de Myrcludex B y el derivado de Myrcludex B modificado con tirosina.

Los lipopéptidos podrían obtenerse con alta pureza según lo determinado por LC/MS en un espectrómetro de masas exacto (Thermo Scientific).

El Myrcludex B y el derivado modificado de tirosina se analizaron por espectrometría de masas. El espectro de masas de Myrcludex B muestra una señal principal en  $\frac{m}{z} = 1800,64$  (z = 3) que corresponde al pico de Myrcludex B (peso molecular = 5399 g/mol) mientras que el espectro de masas del derivado muestra una señal principal en  $\frac{m}{z} = 1854,87$  (z = 3) que corresponde a su peso molecular de 5562 g/mol (Fig. 13).

Radiomarcaje del Myrcludex B modificado con tirosina

30 El radiomarcaje con <sup>131</sup>I del Myrcludex B modificado con tirosina produjo el producto deseado con alta pureza (> 95%) según lo determinado por radio-HPLC. La eficacia del marcaje utilizando el método de cloramina T fue del 65% de la radiactividad aplicada.

Ejemplo 6

Eficiencia de encapsulación

- Se encontró que la recuperación de lípidos después de la purificación por las columnas NAP™-5 fue de 89,51 ± 0,58%. Esto corresponde a una pérdida de lípidos de 10,49 ± 0,58%, lo que resulta en un factor de corrección de pérdida de lípidos de C = 1,12. Los liposomas de GCTE que contienen Myrcludex B mostraron una eficiencia de encapsulación de 65,67 ± 2,91%, que es comparable con el valor determinado de los liposomas estándar (63,10 ± 2,02%). Esto enfatiza la alta eficiencia de encapsulación del método DAC en comparación con otros métodos de preparación comunes, como se mostró anteriormente para los fármacos peptídicos. Se ha encontrado una eficiencia de encapsulación de aproximadamente el 50% para FITC-Dextrano de 70 kDa usando la tecnología de mezcla rápida, mientras que, en contraste, otros métodos de preparación para la incorporación de péptidos en liposomas, como el método de película seguido de extrusión utilizada para la encapsulación de octreotida solo condujo a una eficiencia de encapsulación del 13,0% (m/m) [17].
- 45 Ejemplo 7

Caracterización de partículas

Tamaño de partícula, PDI y potencial zeta.

El método DAC aplicado produjo liposomas de GCTE de Myrcludex B con alta homogeneidad en tamaño, PDI y eficiencia de encapsulación (véase la Tabla 3, a continuación). En comparación con los liposomas estándar, el tamaño y el PDI de los liposomas de GCTE mostraron un aumento moderado, mientras que no se pudo detectar casi ninguna diferencia en el potencial zeta (-3,74 ± 0,28 mV para liposomas estándar y -4,20 ± 0,48 mV para liposomas de GCTE). Un aumento en la cantidad de GCTE (hasta 25% en moles; para datos véase la Fig. 12) condujo a un aumento en el PDI liposomal, mientras que, por el contrario, el tamaño se mantuvo casi constante. Los liposomas que contienen el biopotenciador CpCI (0-25% en moles) mostraron valores constantes con respecto al tamaño del liposoma (para datos véase la Tabla 4, a continuación) mientras que el PDI aumentó cuando se usó 25% en moles de CpCl. Este aumento drástico se remonta a las diferencias en la temperatura de transición de fase, ya que no se pudo observar aglomeración de liposomas.

Tabla 3: Caracterización de partículas de liposomas GCTE y estándar (medias ± SD; n ≥ 5).

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
Liposomas de GCTE-	140,7 ± 4,3	0,156 ± 0,010	-4,20 ± 0,48
Liposomas estándar	131,3 ± 1,5	0,137 ± 0,022	-3,74 ± 0,28

Tabla 4: Caracterización de partículas de liposomas de 1-25% en moles de CpCl/GCTE (medias ± SD; n ≥ 5)

	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
1% mol CpCl/GCTE	127,72 ± 2,13	0,164 ± 0,016	7,29 ± 0,61
10% mol CpCl/GCTE	129,89 ± 5,34	0,204 ± 0,035	17,13 ± 0,74
25 mol CpCl/GCTE	144,99 ± 10,06	0,494 ± 0,050	29,50 ± 1,47

## Crio-EM.

10

Las micrografías de crioelectrones (Fig. 14) muestran la estructura lamelar de una muestra diluida de los liposomas de Myrcludex B estándar y Myrcludex B de GCTE. Se pudo detectar una mezcla de liposomas mono- y oligolamelares, mientras que anteriormente se encontraban principalmente estructuras multilamelares para los liposomas de GCTE mediante el uso de mayores cantidades de GCTE. Por lo tanto, la lamelaridad de los liposomas de GCTE parece depender tanto de la cantidad de GCTE como de la técnica de preparación de liposomas.

### 20 Ejemplo 8

25

30

35

Estabilidad de almacenamiento a largo plazo

Liofilización usando sacarosa y trehalosa como lioprotectores a diferentes relaciones molares.

La liofilización de liposomas que contienen sacarosa y trehalosa en diferentes relaciones molares como lioprotectores dio como resultado un tamaño comparable y PDI para ciertas relaciones molares de sacarosa en comparación con los datos medidos antes del proceso de liofilización (Fig. 16). Con respecto a esta formulación liposomal, la concentración mínima de sacarosa debe ser de al menos 300 mM. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos previos de que el mejor efecto protector para una formulación liposomal que consiste en EPC y colesterol utiliza al menos 0,4 M de sacarosa. Un aumento en la concentración del lioprotector (mostrado para sacarosa 500 mM) no proporciona mejores resultados con respecto al tamaño y PDI de los liposomas. Con respecto a ambos lioprotectores, la sacarosa proporcionó mejores resultados en comparación con la trehalosa (datos véase Fig. 15). Por esta razón, se utilizó sacarosa 300 mM para la siguiente determinación de la tasa de recuperación de Myrcludex B intacto y también para la medición de la humedad residual después del proceso de liofilización.

Tasa de recuperación de Myrcludex B intacto después de liofilización y humedad residual.

Después del proceso de liofilización, la tasa de recuperación de Myrcludex B intacto incorporado en los liposomas de GCTE fue de 83,3 ± 1,3%. El Myrcludex B restante (14,8 ± 1,6%) podría detectarse como el péptido intacto. Se retiró usando una columna NAP-5<sup>TM</sup>.

Para garantizar la estabilidad a largo plazo de los liposomas liofilizados, se debe lograr una baja humedad residual. La humedad residual de la formulación liposomal de Myrcludex B usando sacarosa (300 mM) como lioprotector fue de 4.2 ± 1.5%. Estos hallazgos están de acuerdo con los hallazgos previos que determinan una humedad residual de 2-

4% para los liposomas que consisten en EPC y colesterol usando sacarosa y trehalosa como lioprotectores. Para determinar la estabilidad a largo plazo del producto liofilizado, las muestras se almacenaron a -20 °C durante 3 meses. Después de la resuspensión, se midieron el tamaño, el PDI y la tasa de recuperación. Todos los valores fueron comparables con los valores determinados directamente después del proceso de liofilización (Tabla 5).

5 Tabla 5: Comparación de los liposomas de GCTE rehidratados directamente y 3 meses después de la liofilización (medias ± SD; n P ,3).

	Tamaño (nm)	PDI	Recuperación de Myrcludex B (%)
Después de liofilizar	145,9 ± 4,0	0,156 ± 0,017	83,3 ± 1,3
Después de 3 meses	146,1 ± 3,7	0,163 ± 0,014	82,7 ± 1,6

### Ejemplo 9

20

25

30

35

Prueba de estudio de concepto: ensayos con animales

Acumulación hepática de Myrcludex B usando diferentes formulaciones.

La primera parte de los estudios en animales mostró un aumento significativo en el enriquecimiento de Myrcludex B en el tejido hepático (Fig. 17) usando liposomas de GCTE (1,14% ID/g) en comparación con los liposomas estándar (0,56% ID/g) y péptido libre marcado (0,33% ID/g). Considerando un peso hepático promedio de aproximadamente 6-8 g en una rata Wistar de 250 g, los resultados muestran que al menos el 7% de la dosis inicial de Myrcludex B había sido absorbida. Esto destaca el fuerte aumento en la disponibilidad oral de Myrcludex B por el uso de liposomas de GCTE. Además, se examinó si el pretratamiento con omeprazol para la formulación liposomal de GCTE al 5% molar conduciría a un aumento en la disponibilidad oral de Myrcludex B. Sin embargo, no hubo diferencias significativas aparentes entre el grupo pretratado y el no pretratado (Fig. 17).

En la segunda parte de los estudios en animales se compararon tres concentraciones diferentes de GCTE. A diferencia de las formulaciones liposomales de GCTE al 5% molar y 10% molar, para la formulación liposomal de GCTE-liposomal al 1% molar no se pudo observar un aumento significativo en la disponibilidad oral de Myrcludex B en comparación con los liposomas estándar (Fig. 18). Además, no hubo diferencias significativas entre las formulaciones liposomales de GCTE al 5% en moles y 10% en moles. Por esta razón, el 5% en moles de GCTE parece ser suficiente para el efecto estabilizador de los lípidos de tetraéter.

La adición del biopotenciador cloruro de cetilpiridinio (CpCI; 1-10% en moles) a la formulación liposomal GCTE no mostró un aumento significativo en la disponibilidad oral de Myrcludex B (Fig. 19).

En particular, se ensayó si la adición de biopotenciadores conduciría a un aumento en la disponibilidad oral de Myrcludex B. Para este propósito, se añadieron 1 - 25% en moles del biopotenciador cloruro de cetilpiridinio (CpCI) a la mezcla de lípidos GCTE y se determinaron el tamaño, el PDI y el potencial zeta de los liposomas. Mientras que los liposomas al 1% en moles y 10% en moles de CpCI/GCTE mostraron valores comparables con respecto al tamaño y el PDI, podría observarse un alto aumento en el PDI de los 25 liposomas de CpCI/GCTE al 25% en moles (véase la Tabla 4, *supra*).

Con respecto al alto PDI de los liposomas al 25% en moles de CpCl/GCTE, solo se determinó la absorción hepática de los liposomas al 1% en moles y 10% en moles de CpCl/GCTE en ratas Wistar machos y se comparó con la formulación de GCTE. Con respecto a ambas formulaciones que contienen el biopotenciador CpCl, no se pudo observar un aumento significativo en la disponibilidad oral de Myrcludex B (Figura 19).

### Estudio farmacocinético.

Las muestras de sangre del grupo de liposomas de GCTE (AUC = 3550) mostraron un aumento significativo en la absorción 0-6 h después de la administración oral en comparación con los liposomas estándar (AUC = 2175) y el grupo de péptido libre marcado (AUC = 1705; Fig. 20).

Los ensayos con animales resaltan el potencial de la formulación de GCTE para la aplicación oral de Myrcludex B. En particular, se podría mostrar un aumento de 3,5 veces en la disponibilidad oral de Myrcludex B. Además, utilizando sacarosa como lioprotector, se podría demostrar que el almacenamiento a largo plazo de los liposomas de GCTE mediante liofilización y rehidratación se puede habilitar sin destruir el fármaco peptídico incorporado. Además del uso de liposomas de GCTE, existe una gran cantidad de otros intentos para mejorar la disponibilidad oral de fármacos macromoleculares. En comparación con los liposomas que tienen modificaciones en la superficie, recientemente la estrategia más común para la administración de péptidos orales - por ejemplo recubrimiento de liposomas con quitosano tiolado o quitosano-aprotinina, la formulación de GCTE muestra la gran ventaja de que no se requiere ninguna etapa de acoplamiento. Esto permite una producción de liposomas más rápida y confiable.

# Conclusión:

5

30

En la presente invención, podría establecerse un sistema de administración oral para el fármaco de hepatitis B en investigación Myrcludex B mediante el uso de liposomas de GCTE. El método de película con posterior centrifugación doble asimétrica permitió la preparación rápida y reproducible de liposomas. Los liposomas de GCTE mostraron alta homogeneidad en tamaño, PDI y eficiencia de encapsulación. El almacenamiento a largo plazo de los liposomas podría lograrse mediante liofilización utilizando sacarosa como lioprotector sin destruir el fármaco peptídico incorporado. En conjunto, este estudio muestra que la encapsulación de Myrcludex B en liposomas de GCTE condujo a una mejora significativa en la absorción oral independiente del pretratamiento con omeprazol.

### Listado de secuencias

```
10
      <110> Universität Heidelberg
      <120> Formulación liposomal novedosa para la administración hepática oral de fármacos
      <130> H 3653WO - kl
15
      <150> EP 15 003 010.4
      <151> 21/10/2015
20
      <160> 1
      <170> PatentIn versión 3,5
      <210> 1
25
      <211> 47
      <212> PRT
      <213> Virus de la hepatitis B
      <400> 1
         Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His
                           5
                                                 10
         Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp Asp
                                             25
         Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly
                                        40
```

14

### REIVINDICACIONES

- 1. Una composición liposomal que comprende:
- (a) liposomas que comprenden lípidos de tetraéter (TEL), y
- (b) el lipopéptido Myr-HBVpreS/2-48 (Myrcludex B) como parte de dichos liposomas.
- 5 2. La composición liposomal según la reivindicación 1, en donde dichos TEL se aíslan de Sulfolobus sp.
  - 3. La composición liposomal según la reivindicación 2, en donde dichos TEL se aíslan de Sulfolobus acidocaldarius.
  - 4. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichos TEL se seleccionan del grupo que consiste en glicerilcalditiltetraéter (GCTE), digliceriltetraéter (DGTE) y combinaciones de los mismos.
- 5. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos liposomas comprenden dichos TEL en una cantidad de 1 a 10% en moles en base a la cantidad total de lípidos.
  - 6. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además al menos un agente terapéutico adicional y/o al menos un agente de diagnóstico.
  - 7. La composición liposomal según la reivindicación 6, en donde dicho al menos un agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de proteína quinasa, agentes citostáticos y antibióticos.
- 15 8. La composición liposomal según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde dicho al menos un agente de diagnóstico se selecciona del grupo que consiste en agentes para el diagnóstico de carcinoma hepatocelular (CHC).
  - 9. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicho al menos un agente terapéutico adicional y/o dicho al menos un agente de diagnóstico está encerrado en dichos liposomas o está integrado en la membrana liposomal.
- 20 10. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicho al menos un agente terapéutico adicional y/o dicho al menos un agente de diagnóstico está unido covalentemente a dicho Myrcludex B.
  - 11. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno o enfermedad hepática en un sujeto.
- 12. La composición liposomal para uso según la reivindicación 11, en donde dicho trastorno o enfermedad hepática se selecciona del grupo que consiste en hepatitis viral, hepatitis autoinmune, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y enfermedad de Wilson.
  - 13. La composición liposomal para uso según la reivindicación 12, en donde dicho trastorno o enfermedad hepática es hepatitis B.
- 14. La composición liposomal para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde dicha composición es para administración oral.
  - 15. La composición liposomal según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en la administración hepática oral de al menos un agente terapéutico y/o al menos un agente de diagnóstico.

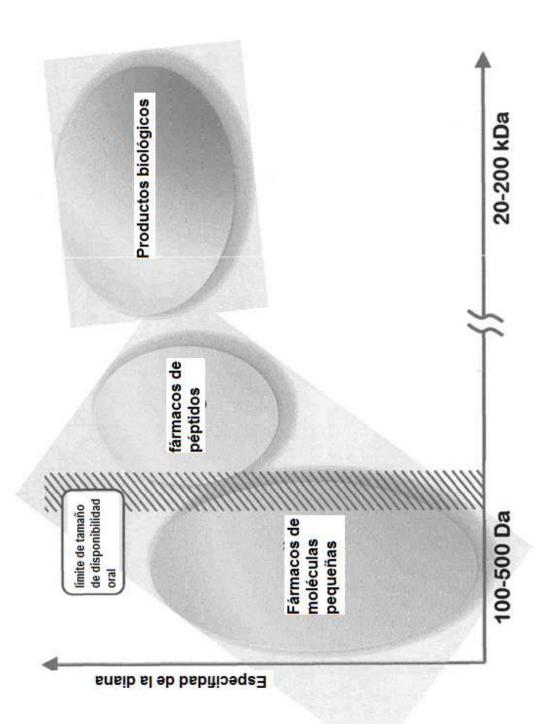


Figura 1

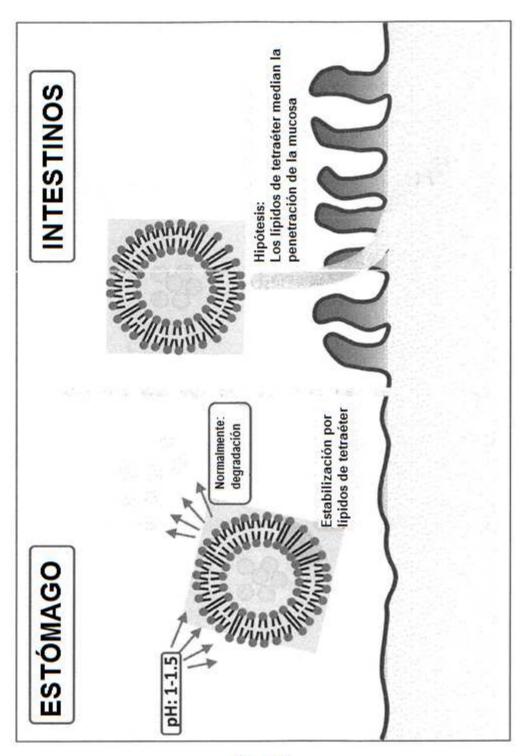


Figura 2

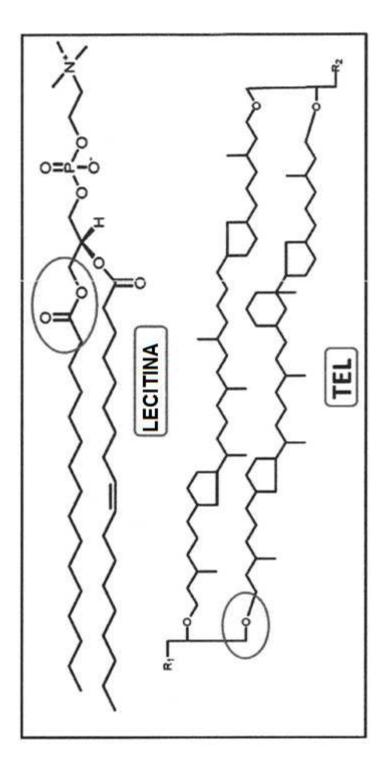
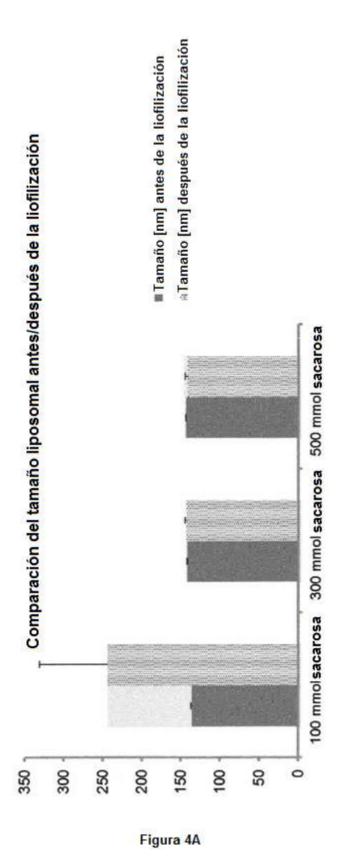
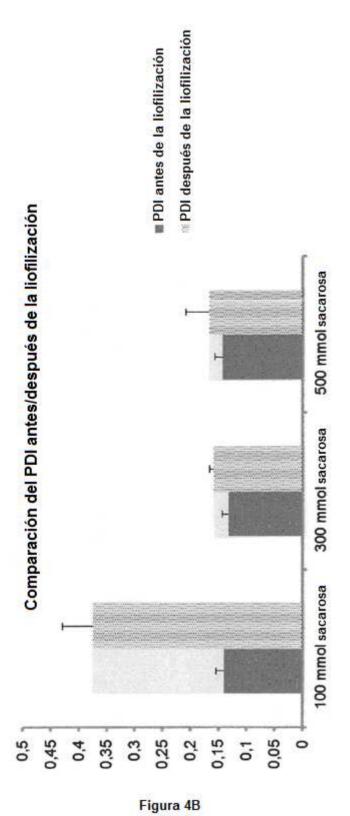


Figura 3





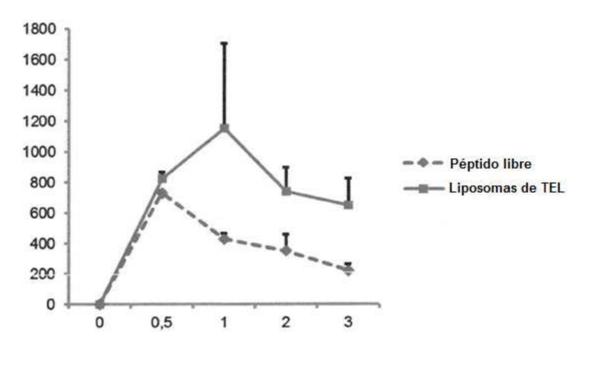
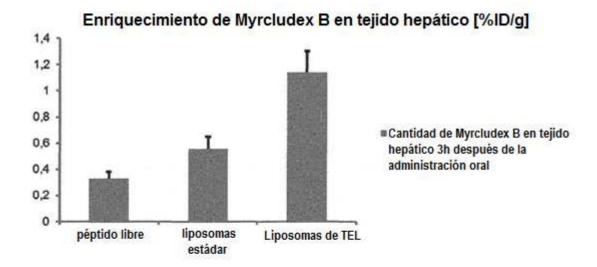


Figura 5



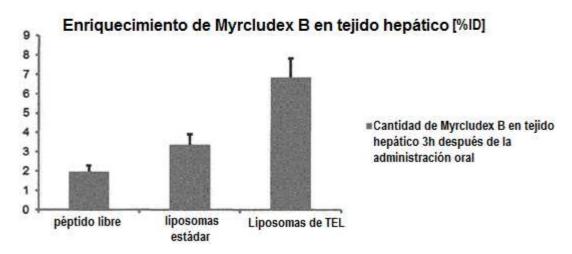


Figura 6

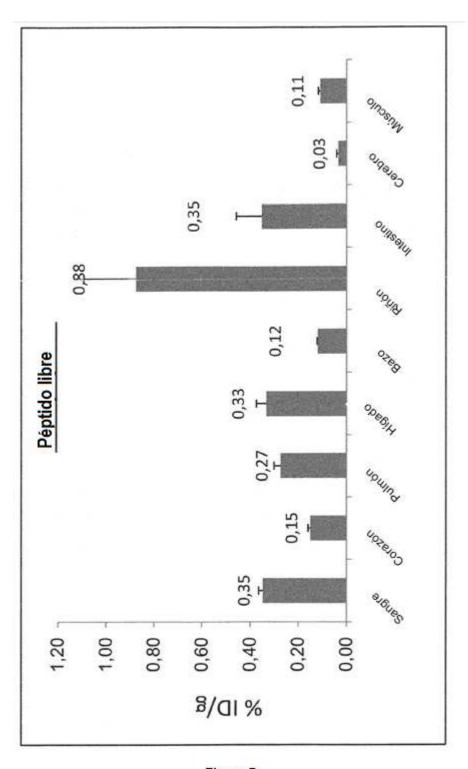


Figura 7

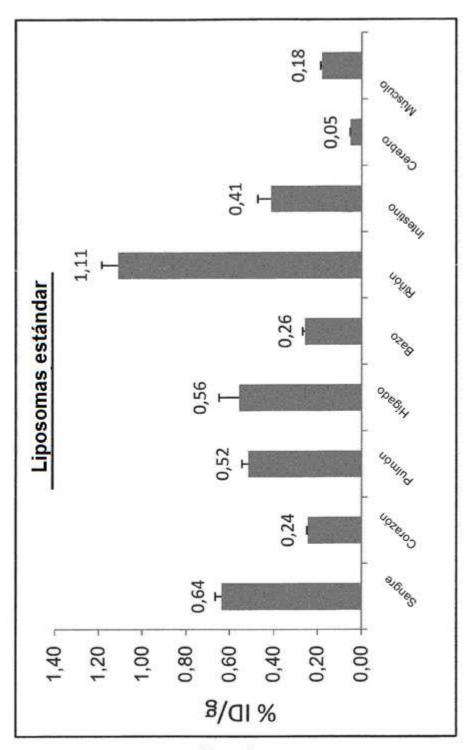


Figura 8

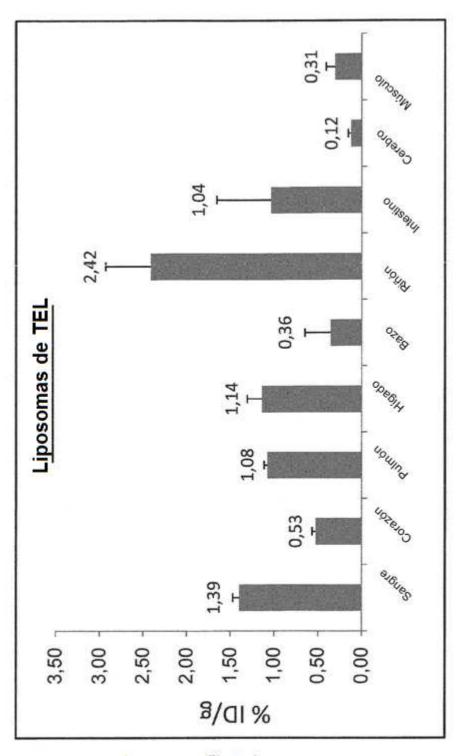


Figura 9

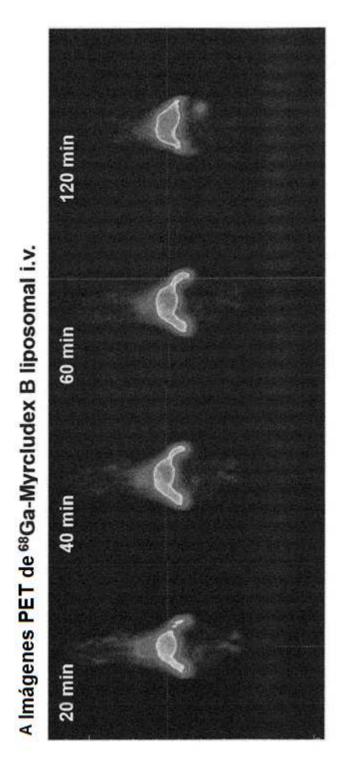


Figura 10A

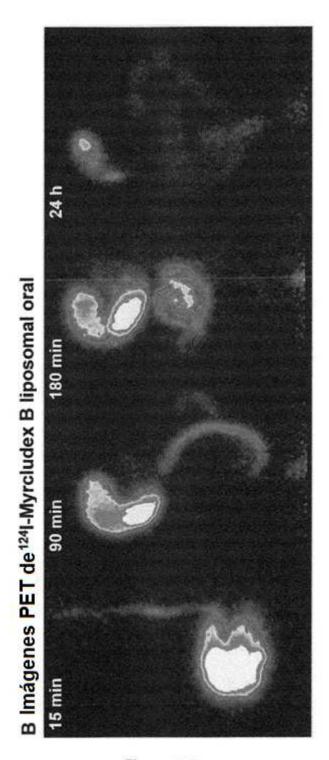


Figura 10 B



Figura 10 C

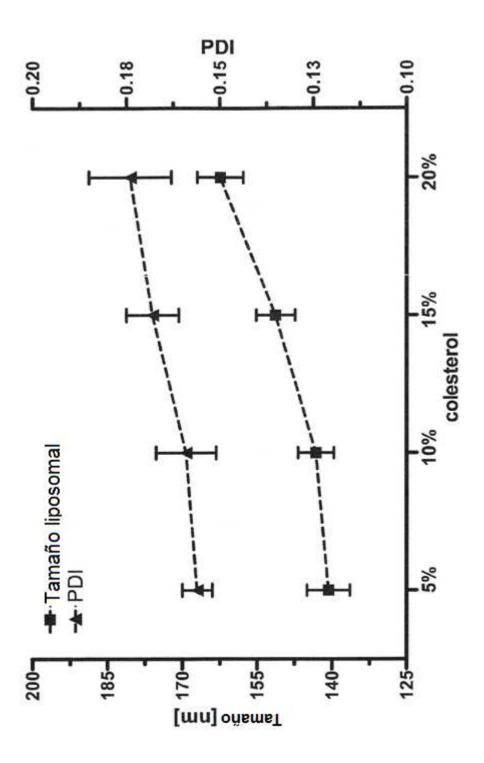


Figura 11

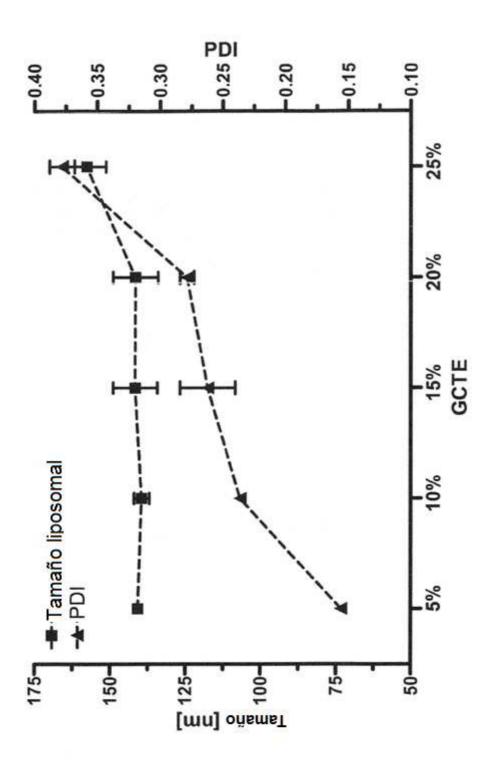


Figura 12

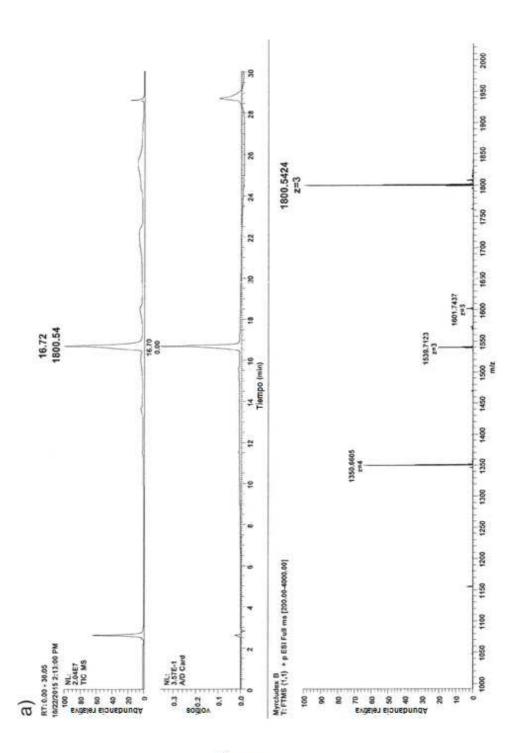


Figura 13 A

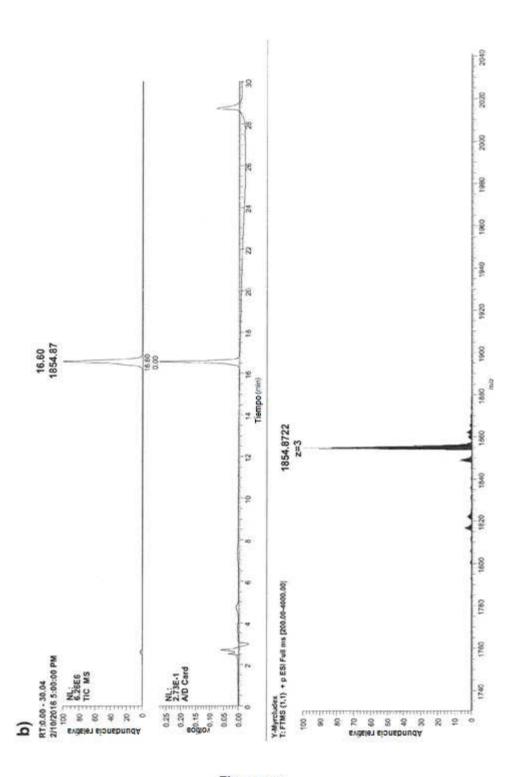


Figura 13 B

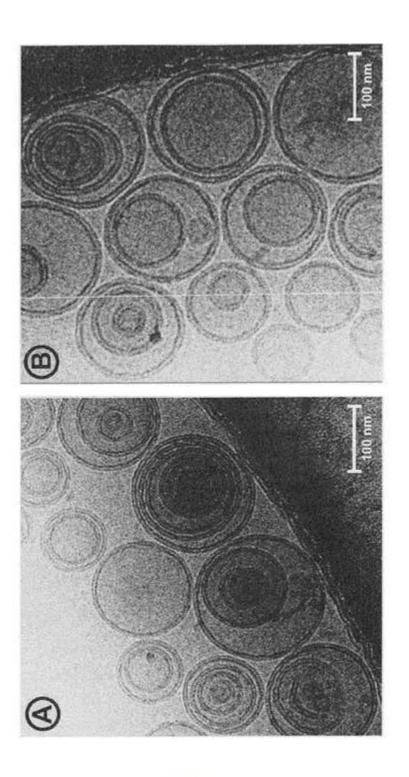


Figura 14

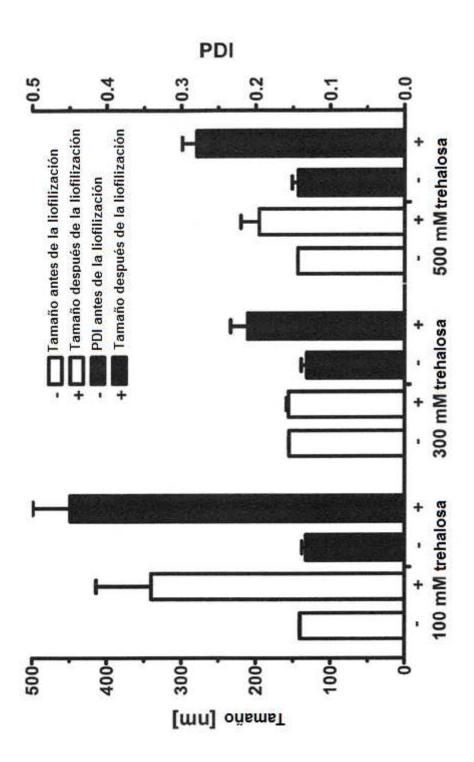


Figura 15

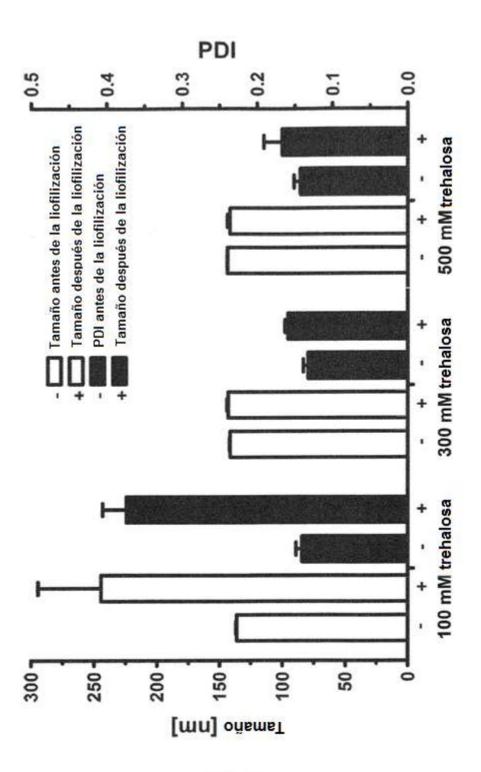


Figura 16

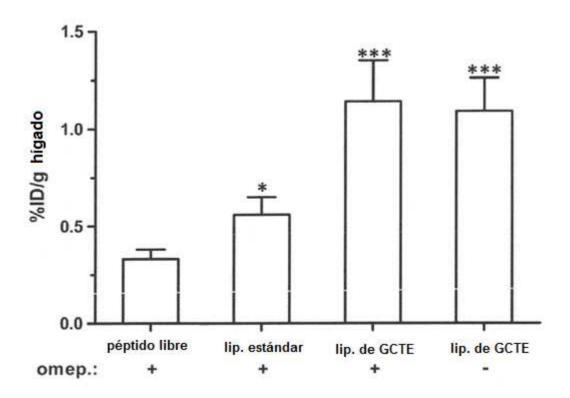


Figura 17

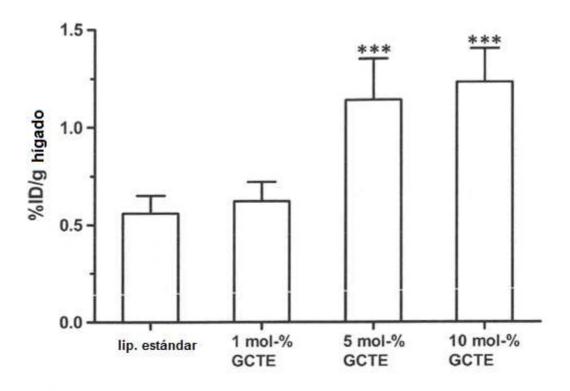


Figura 18

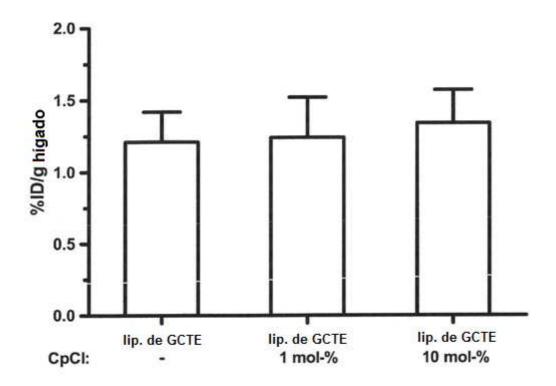


Figura 19

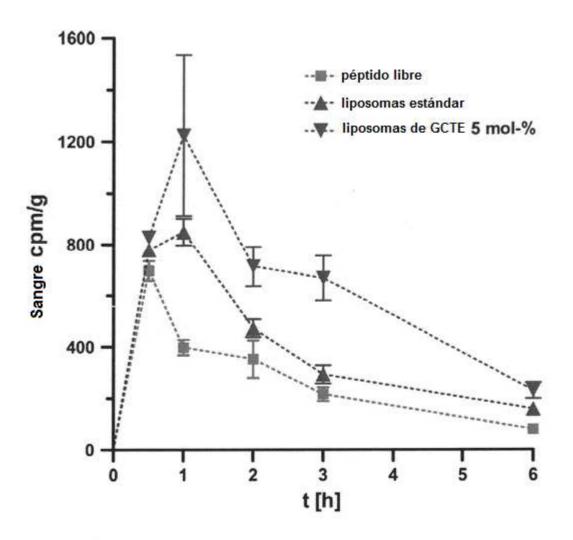


Figura 20