

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 347**

21 Número de solicitud: 201130072

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.01.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.10.2012

Fecha de la concesión:

03.09.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.09.2013

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PROGRESO Y SALUD (33.3%)
Avenida Américo Vespucio, 5 - blq. 2, 2ª pl
41092 Sevilla (Sevilla) ES;
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%) y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**POZO PÉREZ, David;
KLIPPSTEIN MARTIN, Rebecca;
GONZÁLEZ CAMPORA, Ricardo;
TRIGO SÁNCHEZ, Inmaculada y
VARGAS DE LOS MONTEROS, María Teresas**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **NANOLIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON PÉPTIDOS.**

57 Resumen:

Nanoliposomas funcionalizados con péptidos en su superficie que permiten la identificación de tejidos y/o células diana y la liberación de fármacos de forma selectiva, y en particular, nanoliposomas funcionalizados con el péptido VIP. Las composiciones, procedimiento de preparación y usos de dichos nanoliposomas.

ES 2 389 347 B1

DESCRIPCIÓN

NANOLIPOSOMAS FUNCIONALIZADOS CON PÉPTIDOS

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, de la
5 química, la bioquímica y la inmunología, y se refiere al uso de nanoliposomas
funcionalizados con péptidos en su superficie que permiten la identificación de
tejidos y/o células diana y la liberación de fármacos de forma selectiva, y en
particular, a la funcionalización de nanoliposomas con el péptido VIP. La
presente invención también se refiere a las composiciones, al procedimiento de
10 preparación y a los usos de dichos nanoliposomas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Existe un creciente interés por los efectos biológicos de las nanopartículas, de
15 su toxicidad y su alcance en función del medio (M. Tsoli *et al.* 2005. *Small*
(2005); 1:841), por ejemplo, su uso potencial como herramienta terapéutica en
tratamientos de cáncer (El-Sayed *et al.*, 2005. *Nano Letters* Vol.5, 5. 829-834).

Gracias al enorme interés de esos nano-bioconjugados se han desarrollado un
20 amplio rango de aplicaciones tales como distribución de fármacos, marcadores
moleculares, análisis bioquímicos ultrasensibles, desarrollo de dispositivos “lab-
on-a-chip”, construcción de nanocomponentes electrónicos, motores nano-
moleculares...etc [C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin Eds. *Nanobiotechnology*, Wiley-
VCH 2004] .

25 Entre los diferentes tipos de nanopartículas, los nanoliposomas son de especial
relevancia debido a que son los sistemas nanométricos mejor establecidos
clínicamente para el transporte y envío de fármacos gracias a que no son
citotóxicos, son biocompatibles y biodegradables, y además su síntesis es
30 relativamente barata y de fácil escalado en procesos industriales. Los
liposomas en general se han utilizado en terapias para el tratamiento de cáncer
durante más de una década ya que han demostrado reducir de forma sistémica

los efectos secundarios, la toxicidad y facilitando la eliminación del fármaco.(
Torchlin, 2005. *Nat Rev. Drug Discovery* 4, 145).

5 Los nanoliposomas se pueden utilizar como transportadores de diversas
sustancias tanto en su exterior como en su interior y para una variedad de
aplicaciones biomédicas como terapia génica o para el envío de fármacos, de
forma que los ácidos nucleicos o el fármaco vayan protegidos en su interior
evitando su degradación enzimática y su contacto directo con otras células
sanas. Por otra parte permiten el envío de moléculas biológicamente activas de
10 carácter lipófilo y tamaños superiores a los 500 Da, dos de los problemas más
importantes que puede presentar una molécula activa para terminar como
principio activo de un medicamento.

15 Los nanoliposomas de diversos tamaños, normalmente menores de 400 nm
pueden entrar en las zonas en las que existen tumores de forma rápida ya que
la pared del endotelio vascular se encuentra fenestrada. Por el contrario, los
nanoliposomas permanecen en el torrente sanguíneo del tejido sano mediante
la pared del endotelio vascular no fenestrado.

20 Además, la funcionalización de los nanoliposomas con péptidos que
reconocieran con mayor selectividad las dianas terapéuticas, permitiendo el
direccionamiento de forma específica en aquellos caso en los que se conoce
que dichas dianas sobreexpresan los receptores que reconocen dichos
pépidos.

25

Actualmente existen liposomas funcionalizados con péptidos en su superficie.
Por ejemplo, los liposomas funcionalizados con tuftsina han permitido aumentar
la eficacia de estibogluconato sódico (Agrawal & Gupta, 2000. *Adv. Drug Deliv.*
Rev. 41: 135-146; Gupta & Haq, 2005. *Methods Enzymol.* 391: 291-304) y
30 anfotericina B (Gupta & Haq, 2005. *Methods Enzymol.* 391: 291-304, Agrawal
et al., 2002. *J. Drug Target.* 10: 41-45). Sin embargo, aún no se conocen
nanoliposomas funcionalizados con neropéptidos, y una de las limitaciones
para el uso clínico de los neuropéptidos en general, y del VIP en particular, ha

5 sido siempre su corta vida media en circulación. Esto implica la necesidad de administrar crónicamente dicho péptido, aumentando los costes económicos y dificultando su posología en pacientes. Además, el proceso de funcionalización de nanoliposomas con VIP se enfrenta al problema añadido de diseñar un procedimiento en el que quede el extremo carboxilo terminal de VIP libre, ya que es por este extremo por el que interacciona con sus receptores específicos de membrana. Es necesario, por tanto, desarrollar un procedimiento de funcionalización de nanoliposomas con péptidos, dejando el extremo carboxilo terminal de dicho péptido libre para interaccionar con su receptor.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 Los autores de la presente invención han desarrollado nanoliposomas funcionalizados con péptidos en su superficie, estables, no tóxicos, solubles en agua, y compatibles con los sistemas biológicos, y un procedimiento para su obtención, que son útiles para vehiculizar principios activos y/o composiciones farmacéuticas. Además, han demostrado que la funcionalización de VIP en la superficie del nanoliposoma, optimizando su síntesis a un tamaño de 100 nm

20 se maximiza su entrada en las zonas con tumores debido al endotelio vascular fenestrado, y a la vez se permite su direccionamiento de forma específica en aquellos caso en los que se conoce que las células cancerosas sobreexpresan los receptores de la familia de VIP del tipo siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, como es el caso del cáncer de próstata. Además de

25 permitir que VIP actúe como agente terapéutico sobre células diana o como modo de liberación de fármacos sobre células que sobreexpresan receptores VIP, aumenta la vida media de la molécula unida a la misma, ya que dificulta el ataque proteolítico.

30 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un nanoliposoma funcionalizado con un péptido en su superficie, de ahora en adelante, nanoliposoma de la invención. En una realización preferida, el extremo carboxilo-terminal del péptido queda libre, pudiendo interaccionar con su

receptor mediante su extremo carboxilo-terminal. En otra realización preferida, el péptido se selecciona de la lista que comprende: glucagon, GIP (*gastric inhibitory polypeptide*), secretina, hormona de crecimiento, somatoliberina, somatotropina, péptido PHI (*peptide histidine isoleucine*), péptido PHM (Peptide Histidine-Methionine), PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptides*), adrenomedulina, corticostatina y VIP(*vasoactive intestinal peptide*).

Una de las limitaciones para el uso clínico de los péptidos en general, fundamentalmente de los neuropéptidos, y del VIP en particular, es su corta vida media en circulación, lo que haría necesaria la administración crónica del mismo, aumentando los costes económicos y dificultando su posología al paciente. La unión de los péptidos a los nanoliposomas, y en concreto de VIP, aumenta la vida media de las moléculas unidas a los mismos, ya que dificulta el ataque proteolítico.

Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido es un neuropéptido, y más preferiblemente, es el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Tal como se entiende en esa memoria, un neuropéptido se refiere a pequeñas moléculas parecidas a proteínas de un enlace peptídico de dos o más aminoácidos y que se diferencian de proteínas por su longitud, y porque se originan por transducción sináptica cerebral. Su dimensión puede variar desde dos aminoácidos, como la carnosina, hasta más de 40 como la CRH (*Corticotropin-releasing hormone* u hormona liberadora de corticotropina). Tienen función cerebral tanto estimulante como inhibidora, produciendo efectos como la analgesia, apetito, sueño, etcétera.

En esta memoria se entiende como péptido intestinal vasoactivo (VIP por sus siglas en inglés *vasoactive intestinal peptide*), es una hormona polipeptídica formada por 28 residuos de aminoácidos y es producida por muchas estructuras del cuerpo humano como el aparato digestivo, el páncreas y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo en el cerebro. Se caracteriza por su

propiedad vasodilatadora y su actividad en el sistema nervioso periférico (por ejemplo, el VIP relaja los pulmones, la traquea y la musculatura gástrica). Inhibe la secreción de enzimas gástricas y estimula la secreción de glucagón, insulina y somatostatina, aumenta la adenilciclase, así como la secreción biliar
5 en el hígado.

El VIP, o "*vasoactive intestinal peptide*", también denominada como PHM27 ó MGC13587. Está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 6 (6q25). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 1.

10

En el contexto de la presente invención, VIP se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

15 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

20 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

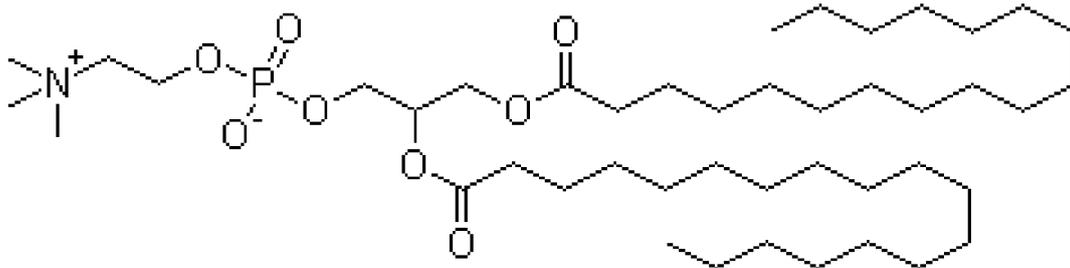
d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las
25 características estructurales el péptido VIP.

Los nanoliposomas de diversos tamaños, normalmente menores de 400 nm pueden entrar en las zonas en las que existen tumores de forma rápida ya que la pared del endotelio vascular se encuentra fenestrada. Por el contrario, los
30 nanoliposomas permanecen en el torrente sanguíneo del tejido sano mediante la pared del endotelio vascular no fenestrado.

En otra realización preferida de la invención, el nanoliposoma comprende:

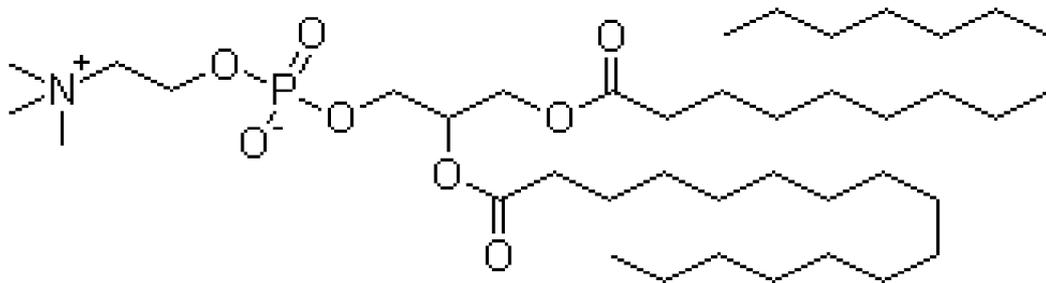
- (a) 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, fórmula I),
 (b) 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC, fórmula II), y
 al menos un fosfolípido pegilado.

5



(I)

10



(II)

15

o cualquiera de sus sales, derivados o análogos, o cualquiera de sus
 20 combinaciones, de los compuestos de fórmula (I) y (II).

En otra realización preferida, el fosfolípido pegilado es:

combinaciones, de los compuestos de fórmula (I) y (II).

En otra realización preferida, el fosfolípido pegilado es:

5

- a. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen glicol-Maleimida (DSPE-PEG-Maleimida),
- b. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen glicol (DSPE-PEG),

10 o una combinación de ambos.

En otra realización preferida, el nanoliposoma se obtiene por un procedimiento que comprende:

15

a. formar un film de lípidos mediante evaporación de fase reversa de un compuesto que comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado,

20

b. añadir el solvente orgánico y la fase acuosa quedando finalmente un ratio de volumen de aproximadamente 4:1 (fase orgánica:fase acuosa),

25

c. someter el sistema de dos fases a sonicación hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase, todo el solvente orgánico mediante un rotavapor hasta obtener una fase de gel,

d. convertir el gel en una suspensión acuosa, donde se han formado los liposomas

30

e. convertir los liposomas de (e) en nanoliposomas mediante sonicación, hasta un tamaño medio menor de 500 nm, preferiblemente de un tamaño medio de 400 nm o menor, y más preferiblemente de un tamaño medio menor de 200 nm,

f. purifica los nanoliposomas mediante una columna de Sephadex, preferiblemente G-50,

durante al menos 20 horas, 22 horas, y mucho más preferiblemente, durante 24 horas.

Más preferiblemente, se obtiene por un procedimiento donde el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4. Aún más preferiblemente el DSPE-PEG y el DSPE-PEG-Maleimida se encuentran a una concentración final del 5 y 10%, respectivamente. Más preferiblemente, el solvente orgánico que consiste en una mezcla de di-etil-éter y cloroformo a aproximadamente el 50%. Más preferiblemente, el ratio en volumen fase orgánica: fase acuosa es de aproximadamente 4:1. Más preferiblemente, el sonicado del paso (c) se hace en un baño sonicador hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase, preferiblemente durante 3 a 5 minutos. Aún más preferiblemente, la evaporación de todo el solvente orgánico mediante el rotavapor del paso (d) hasta alcanzar una fase de gel, se realiza a una temperatura de netre 35 y 55 °C, y más preferiblemente de 40°C y a una rotación de entre 100 y 150 rpm, y más preferiblemente de 120 rpm. Más preferiblemente la sonicación de la muestra del paso (f) se realiza en un baño sonicador a temperatura superior a la de su fase de transición, y preferiblemente a más de 60°C, para controlar el tamaño del nanoliposoma. Más preferiblemente, el nanoliposoma se ajusta a un tamaño medio del el tamaño medio es de entre 75 y 125 nm, preferiblemente de entre 85 y 115 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 95-105 nm.

En otra realización preferida, la funcionalización de los nanoliposomas con el péptido se realiza mediante la adición de al menos 100 µg del péptido, más preferiblemene 125 µg del péptido, y aún mucho más preferiblemene de al menos 150 µg del péptido modificado a la muestra de nanoliposomas y manteniéndolo en agitación y a temperatura ambiente más de 10 horas, y más preferiblemente entre 12 y16 horas. Más preferiblemente, el péptido es un neuropéptido, y aún más preferiblemente, el neuropéptido es el VIP.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del nanoliposoma de la invención, para la vehiculización de principios activos.

Se conocen tres receptores de VIP denominados VPAC₁, VPAC₂ y PAC₁. El receptor VPAC₁ se expresa en neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como son los de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria, mientras que VPAC₂ solo se ha encontrado en unos pocos tumores [8]. PAC₁, por el contrario, se expresa fundamentalmente en tumores originados en los sistemas neuronales y endocrinos, como pueden ser por ejemplo los tumores gliales (glioblastomas, neuroblastomas, astrocinomas, etc.), o adenomas pituitarios.

10

Por otro lado, los efectos biológicos del neuropéptido VIP tienen un interés creciente por su capacidad moduladora en patologías en las que hay un componente inflamatorio y/o autoinmunitario [Grimm, M. C. *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171, 4990–4994; Pozo, D. (2003) *Trends Mol. Med.* 9, 211–217; Ganea, D., and Delgado, M. (2002). *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 229–237; Delgado, M. *et al.* (2003). *Trends Immunol.* 24, 221–224; Pozo *et al.* (2009). *J Immunol* 183, 4346-4359].

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el principio activo tiene actividad antitumoral. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el principio activo tiene actividad antiinflamatoria.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del nanoliposoma de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular. En una realización preferida, el nanoliposoma tiene un principio activo, preferiblemente de actividad antitumoral. En otra realización preferida la enfermedad que cursa con proliferación celular se selecciona de la lista que comprende: neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como son los de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria. En una realización más preferida, la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer de próstata.

Adicionalmente, la funcionalización de nanoliposomas con VIP se enfrenta al problema de diseñar un método eficaz por el que se pueda sintetizar de forma que su extremo carboxilo-terminal quede libre, ya que es por éste extremo por donde interacciona con sus receptores específicos de membrana. Los autores de la presente invención han desarrollado también un procedimiento que permite la funcionalización de VIP en nanoliposomas dejando intacta su capacidad de interacción con sus receptores específicos, lo que permitirá formular estrategias de detección y liberación selectiva *in vivo* de fármacos sobre células que interese eliminar (caso por ejemplo de las tumorales), o bien expandir (mediante la administración de factores tróficos) en función de la patología que se pretenda abordar.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de nanoliposomas funcionalizado con fármacos, que comprende las etapas de:

- a. formar un film de lípidos mediante evaporación de fase inversa de un compuesto que comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado,
- b. añadir el solvente orgánico y la fase acuosa quedando finalmente un ratio de volumen de aproximadamente 4:1 (fase orgánica:fase acuosa),
- c. someter el sistema de dos fases a sonicación hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase,
- d. evaporar todo el solvente orgánico mediante un rotavapor hasta obtener una fase de gel,
- e. convertir el gel en una suspensión acuosa, donde se han formado los liposomas
- f. convertir los liposomas de (e) en nanoliposomas mediante sonicación, hasta un tamaño medio menor de 500 nm, preferiblemente de un tamaño medio de 400 nm o menor, y más preferiblemente de un tamaño medio menor de 200 nm,

- g. purifica los nanoliposomas mediante una columna de Sephadex, preferiblemente G-50,
- h. añadir el péptido a los nanoliposomas del paso (g) y mantener en agitación y temperatura ambiente al menos 10 horas, y preferiblemente entre 12 y 16 horas, y
- i. purificar la mezcla resultante del paso (h) mediante diálisis frente a agua desionizada durante al menos 15 horas, preferiblemente durante al menos 20 horas, 22 horas, y mucho más preferiblemente, durante 24 horas.

10

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

20

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o

25

30

gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz, etc.

5 Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

10 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de principio activo, o de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o de sus combinaciones, que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá
15 determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los
20 técnicos en la materia.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención, estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación
25 del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función
30 de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

5

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

10

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

15

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a los principios activos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Estructura del neuropéptido péptido intestinal vasoactivo (VIP).

5 **Figura 2:** Determinación de péptido VIP en la superficie del nanoliposoma cargado con una sustancia biológicamente relevante, en este caso doxorubicina.

Figura 3: Caracterización del tamaño de los naoliposomas mediante Dynamic
10 Light Scattering (DLS).

Figura 4: Caracterización funcional de la interacción con receptores VPAC (producción de AMPc, segundo mensajero intracelular del sistema efector/receptor de VIP sobre líneas tumorales de cáncer de próstata.
15

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los
20 nanoliposomas funcionalizados con VIP en el reconocimiento específico de las células que expresan sus receptores.

La producción de AMPc se ha medido mediante un ensayo de bioluminiscencia utilizando el ensayo de Promega cAMP-GLO™ según las instrucciones del fabricante. Este ensayo está basado en la disminución de la producción de luz
25 acoplado a luciferasa cuando las concentraciones aumentadas de AMPc producen una activación de la proteína kinasa A y una disminución concomitante del ATP disponible para la reacción de detección antes indicada.

La gráfica (Fig. 4) de los resultados obtenidos en células DU145 (n=4) (línea celular humana de cáncer de próstata) demuestra una producción de AMPc
30 incrementada específicamente tras estimulación de las mismas durante 30

minutos con nanoliposomas de VIP a una concentración efectiva
funcionarizada de VIP de 10^{-7} M.

REIVINDICACIONES

- 5
- 1- Un nanoliposoma funcionalizado con un péptido en su superficie.
- 2- El nanoliposoma según la reivindicación anterior, donde el extremo carboxilo-terminal del péptido queda libre.
- 10
- 3- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el péptido es el péptido VIP.
- 15
- 4- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado.
- 20
- 5- El nanoliposoma según la reivindicación anterior, donde el fosfolípido pegilado es:
- a. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen glicol-Maleimida) (DSPE-PEG-Maleimide),
- b. 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen glicol) (DSPE-PEG),
- o una combinación de ambos.
- 25
- 6- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, obtenible mediante un procedimiento que comprende:
- 30
- a. formar un film de lípidos mediante evaporación de fase reversa de un compuesto que comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado,

- b. añadir el solvente orgánico y la fase acuosa quedando finalmente un ratio de volumen de aproximadamente 4:1 (fase orgánica:fase acuosa),
- 5 c. someter el sistema de dos fases a sonicación hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase,
- d. evaporar todo el solvente orgánico mediante un rotavapor hasta obtener una fase de gel,
- e. convertir el gel en una suspensión acuosa, donde se han formado los liposomas
- 10 f. convertir los liposomas de (e) en nanoliposomas mediante sonicación, hasta un tamaño medio de 500 nm, preferiblemente de un tamaño medio de 400 nm o menor, y más preferiblemente de un tamaño medio menor de 200 nm,
- 15 g. purifica los nanoliposomas mediante una columna de Sephadex, preferiblemene G-50,
- a. añadir añadir al menos 100 μg del péptido, preferiblemente en una cantidad aproximada de 150 μg , a los nanoliposomas del paso (f) y mantener en agitación y temperatura ambiente al menos 10 horas, y preferiblemente entre 12 y 16 horas, y
- 20 h. purificar la mezcla resultante del paso (h) mediante diálisis frente a agua desionizada durante al menos 15 horas, preferiblemente durante al menos 20 horas, 22 horas, y mucho más preferiblemente, durante 24 horas.
- 25 7- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4.
- 30 8- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el DSPE-PEG y el DSPE-PEG-Maleimide se encuentran a una concentración final del 5 y 10%, respectivamente.

- 9- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el solvente orgánico que consiste en una mezcla de di-etil-éter y cloroformo a aproximadamente el 50%.
- 5 10-El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el ratio en volumen fase orgánica: fase acuosa es de aproximadamente 4:1.
- 10 11-El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, donde el sonicado del paso (c) se hace en un baño sonicador hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase.
- 15 12-El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, donde la evaporación de todo el solvente orgánico mediante el rotavapor del paso (d) hasta alcanzar una fase de gel, se realiza a una temperatura de 40°C y a una rotación de 120 r.p.m..
- 20 13- El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 6-12, donde sonicación de la muestra del paso (f) se realiza en un baño sonicador a más de 60°C.
- 25 14-El nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el tamaño medio es de entre 75 y 125 nm, preferiblemente de entre 85 y 115 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 95-105 nm.
- 30 15- Uso de un nanoliposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la vehiculización de principios activos.
- 16-Uso del nanoliposoma según la reivindicación anterior, donde el principio activo tiene actividad antitumoral.

- 17-Uso del nanoliposoma según la reivindicación 15, donde el principio activo tiene actividad antiinflamatoria.
- 5 18-Uso de un nanoliposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para la vehiculización de composiciones farmacéuticas.
- 10 19-Uso de un nanoliposoma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con proliferación celular.
- 15 20-Uso del nanoliposoma según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular se selecciona de la lista que comprende: neoplasmas epiteliales malignos, cáncer de pulmón y otros cánceres como cáncer de estómago, colon, mama, próstata, hígado y vejiga urinaria.
- 20 21-Uso del nanoliposoma según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular es cáncer de próstata.
- 25 22-Un procedimiento de obtención de nanoliposomas funcionalizado con péptidos, que comprende las etapas de:
- 30 a. formar un film de lípidos mediante evaporación de fase inversa de un compuesto que comprende , 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y al menos un fosfolípido pegilado,
- b. añadir el solvente orgánico y la fase acuosa quedando finalmente un ratio de volumen de aproximadamente 4:1 (fase orgánica:fase acuosa),

- 5
- c. someter el sistema de dos fases a sonicación hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase,
 - d. evaporar todo el solvente orgánico mediante un rotavapor hasta obtener una fase de gel,
 - e. convertir el gel en una suspensión acuosa, donde se han formado los liposomas
 - f. convertir los liposomas de (e) en nanoliposomas mediante sonicación, hasta un tamaño medio menor de 500 nm, preferiblemente de un tamaño medio de 400 nm o menor, y más
 - 10 preferiblemente de un tamaño medio menor de 200 nm,
 - g. purifica los nanoliposomas mediante una columna de Sephadex, preferiblemente G-50,
 - h. añadir el péptido a los nanoliposomas del paso (g) y mantener en agitación y temperatura ambiente de al menos 10 horas, y
 - 15 preferiblemente entre 12 y 16 horas, y
 - i. purificar la mezcla resultante del paso (h) mediante diálisis frente a agua desionizada durante al menos 15 horas, preferiblemente durante al menos 20 horas, 22 horas, y mucho más preferiblemente, durante al menos 24 horas.
- 20
- 23-El procedimiento según la reivindicación 22, donde el DPPC y el DSPC se encuentran en una relación de masa de aproximadamente 6:4.
- 24-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-23, donde
- 25 el DSPE-PEG y el DSPE-PEG-Maleimide se encuentran a una concentración final del 5 y 10%, respectivamente.
- 25-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-24, donde
- 30 el solvente orgánico que consiste en una mezcla de di-etil-éter y cloroformo a aproximadamnte el 50%.

- 26-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-25, donde el ratio en volumen fase orgánica: fase acuosa es de aproximadamente 4:1.
- 5 27-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-26, donde el sonicado del paso (c) se hace en un baño sonicador hasta que la muestra aparece dispersa en una sola fase.
- 10 28-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-27, donde la evaporación de todo el solvente orgánico mediante el rotavapor del paso (d) hasta alcanzar una fase de gel, se realiza a una temperatura de 40°C y a una rotación de 120 r.p.m..
- 15 29- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-28, donde sonicación de la muestra del paso (f) se realiza en un baño sonicador a más de 60°C.
- 20 30-El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22-29, donde el tamaño medio es de entre 75 y 125 nm, preferiblemente de entre 85 y 115 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 95-105 nm.

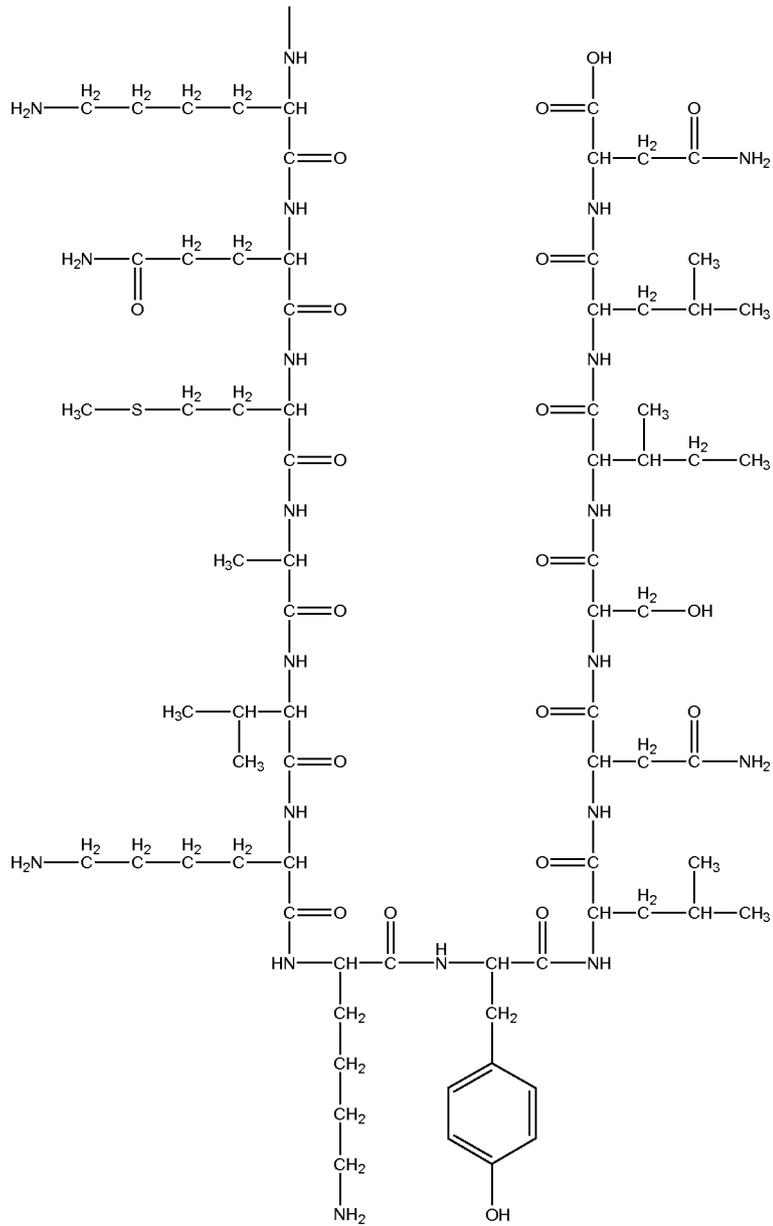


FIG. 1

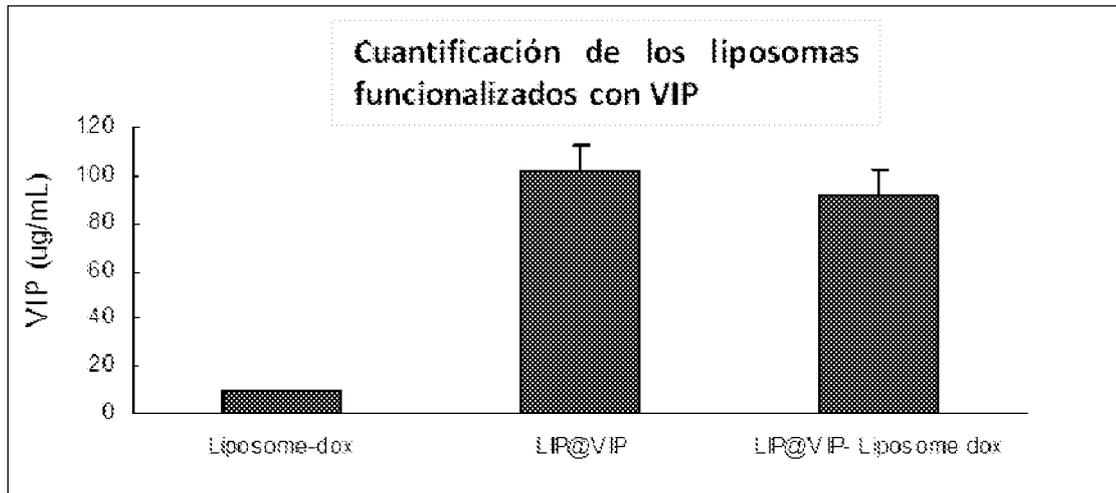


FIG. 2

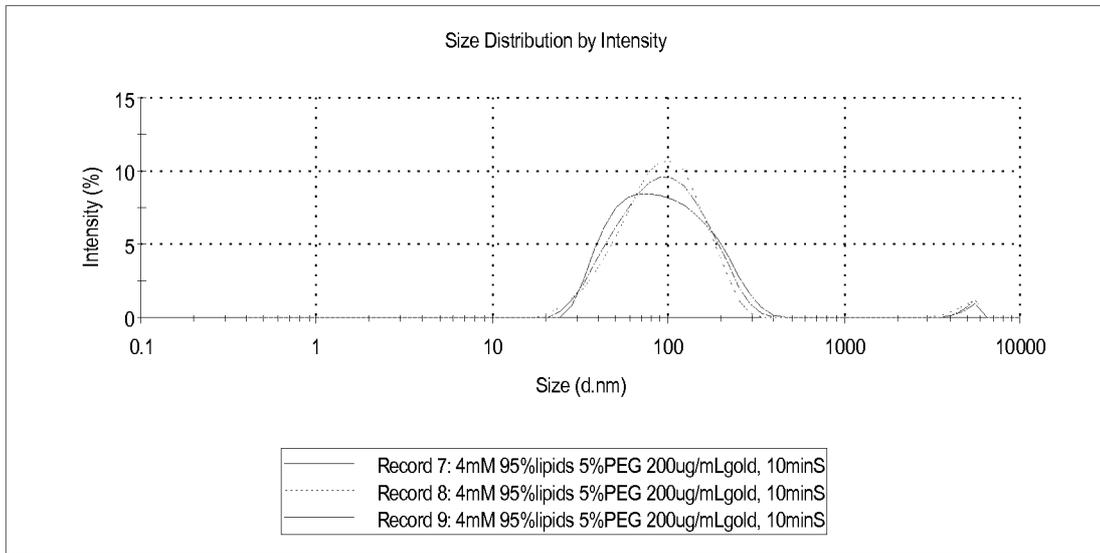


FIG. 3

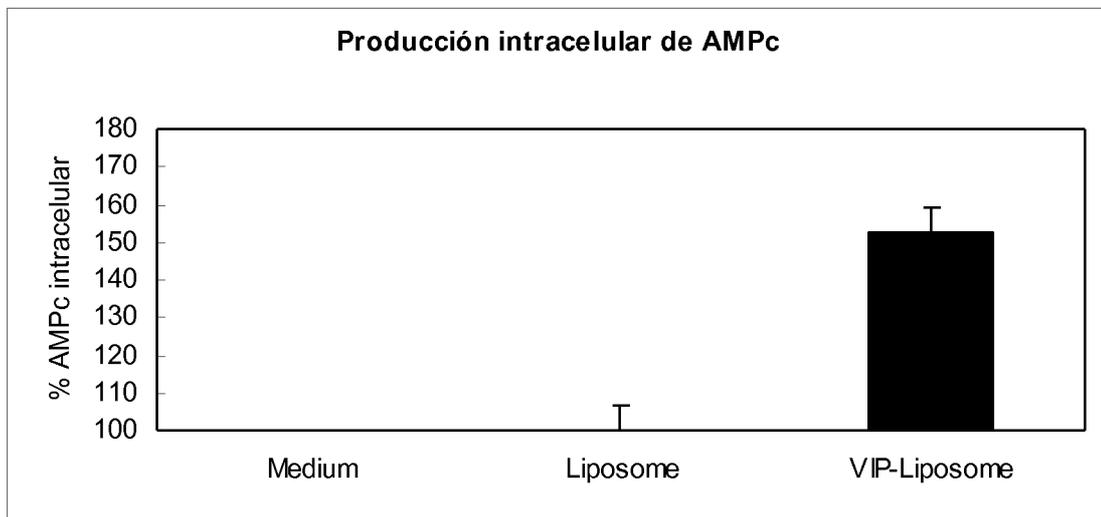


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130072

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.01.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 2009142525 A2 (UNIVERSIDADE DE COIMBRA) 26.11.2009, ejemplo 1; reivindicación 9.	1,2,4-30 3
X Y	NALLAMOTHU, R. et al. "A tumor vasculature targeted liposome delivery system for Combrestatin A4: design, characterization and in vitro evaluation". AAPS PHARM SCI TECH. 2006. Vol. 7, N.º. 2, páginas E1-E10, todo el documento especialmente figuras 1 y 2.	1,2,4-30 3
X	DAGAR, S. et al. "VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies". JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. 28.08.2003. Vol. 91, N.º. 1-2, páginas 123 -133; todo el documento, especialmente materiales y métodos.	1-30
X	SCHIFFELERS, R.M. et al. "Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin". 28.08.2003. Vol. 91, N.º. 1-2, páginas 115 -122; todo el documento especialmente materiales y figura 1.	1,2,4-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.10.2012

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/127 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61K35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 4-30	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP en su superficie. El nanoliposoma de la invención contiene un conjugado de estructura LIPIDO-PEG-MALEIMIDA en el que el lípido es el fosfolípido DSPE. También comprende DSPE-PEG, DSPC y DPPC. El péptido VIP mantiene su extremo carboxilo libre de forma que puede unirse a su receptor específico que se expresa en algunas células tumorales y por el extremo amino, en el que se ha introducido una cisteína, se une a la maleimida. El nanoliposoma de la invención se utiliza para dirigir fármacos antitumorales hacia células cancerígenas que expresan en su superficie el receptor del péptido VIP.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009142525 A2 (UNIVERSIDADE DE COIMBRA)	26.11.2009
D02	NALLAMOTHU, R. et al. "A tumor vasculature targeted liposome delivery system for Combrestatin A4: design, characterization and in vitro evaluation". AAPS PHARM SCI TECH. 2006. Vol. 7, N°. 2, páginas E1-E10, todo el documento especialmente figuras 1 y 2.	
D03	DAGAR, S. et al. "VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies". JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. 28.08.2003. Vol. 91, N°. 1-2, páginas 123 -133; todo el documento, especialmente materiales y métodos.	
D04	SCHIFFELERS, R.M. et al. "Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin". 28.08.2003. Vol. 91, N°. 1-2, páginas 115 -122; todo el documento especialmente materiales y figura 1.	

El documento D01, describe un nanoliposoma que transporta un fármaco hacia el receptor del péptido que se localiza en su superficie. El nanoliposoma puede estar constituido por DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimida (páginas 11 y 20) y tiene en su superficie un péptido modificado con un grupo SH que se une a la maleimida.

El documento D02, describe un liposoma dirigido que está funcionalizado en su superficie con un péptido que tiene afinidad por una integrina expresada en una célula tumoral. DSPE-PEG y DSPE-PEG- maleimida son componentes del liposoma y la Figura 2 del documento, representa la forma en la que el péptido se acopla al liposoma.

El documento D03, describe un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP, que tiene entre sus componentes DSPE-PEG. El liposoma contiene el radionúclido Tc99m-HMPAO y se utiliza para realizar un diagnóstico temprano de cáncer de mama que presenta alta densidad de receptores de VIP.

El documento D04, presenta los resultados de eficacia antitumoral de un liposoma que contiene doxorubicina, funcionalizado con un péptido RGD acoplado a DSPE-PEG-maleimida que lo dirige a un carcinoma de colon que expresa $\alpha\beta 3$ integrina.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD****Reivindicación 3**

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, un nanoliposoma que tenga como componentes exclusivamente DSPE-PEG-Maleimida, DSPE-PEG, DSPC y DPPC funcionalizado con el péptido VIP. La reivindicación 3 cumple el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

Reivindicaciones 1-2, 4-30

Las reivindicaciones 1-2 y las 4-30 en la medida en que dependen de las anteriores, están redactadas de una forma tan general que alcanzan el contenido de la información divulgada en los documentos D01-D04. Los nanoliposomas funcionalizados en su superficie con péptidos para así, ser dirigidos a receptores específicos están ampliamente descritos en el estado de la técnica. También están ampliamente descritos los nanoliposomas que tienen entre sus componentes DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimide. El liposoma descrito en el documento D01, tiene entre sus componentes DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimide. El liposoma que se describe en el documento D02, está formado entre otros por DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimide. El liposoma se funcionaliza en su superficie con un péptido mediante el mismo mecanismo descrito en la presente solicitud y tiene un tamaño de 100-120 nm y el péptido está modificado con un grupo sulfhidrilo. Los documentos D03 y D04, describen respectivamente un liposoma que tiene entre sus componentes DSPE-PEG funcionalizado con el péptido VIP que se dirige al receptor de VIP expresado por células de cáncer de mama y un liposoma funcionalizado con un péptido RGD que se une al componente DSPE-PEG-Maleimida del liposoma y que transporta doxorubicina hacia células tumorales que expresan el receptor del péptido RGD. Las reivindicaciones 1-2, 4-30 no cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-30

Del contenido de los documentos D01-D04, resultaría obvio para un experto en la materia la obtención de un nanoliposoma funcionalizado con el péptido VIP en su superficie y formado por los fosfolípidos DSPC, DPPC, DSPE-PEG y DSPE-PEG-Maleimide todos ellos conocidos en el estado de la técnica como componentes de liposomas. La combinación de los 4 componentes del nanoliposoma de la invención y su funcionalización con el péptido VIP, no supone un gran esfuerzo inventivo respecto a lo descrito en el estado de la técnica anterior; por tanto, las reivindicaciones 1-42 carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito del Art. 8 de la Ley de Patentes 11/1986.