

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 392**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 38/41** (2006.01)  
**A61K 9/127** (2006.01)  
**C07K 14/795** (2006.01)  
**A61K 47/54** (2007.01)  
**A61K 47/69** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2016 PCT/US2016/028102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2016 E 16780996 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2020 EP 3283056**

54 Título: **Nanoestructuras que comprenden conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido y etiquetas de polihistidina**

30 Prioridad:  
**16.04.2015 US 201562148292 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2021**

73 Titular/es:  
**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK UNIVERSITY AT BUFFALO (50.0%)  
Office Of Science, Technology Transfer  
Economic Outreach, Baird Research Park, Suite 111, 1576 Sweet Home Road  
Amherst, NY 14228-2567, US y  
PATH (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**LOVELL, JONATHAN;  
SHAO, SHUAI;  
GENG, JUMIN;  
HUANG, WEI-CHIAO;  
LEE, SHWU-MAAN y  
KING, CHARLES RICHTER**

74 Agente/Representante:  
**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 865 392 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nanoestructuras que comprenden conjugados de porfirina de cobalto-fosfolípido y etiquetas de polihistidina

## 5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente invención se refiere generalmente a composiciones de administración y más particularmente a composiciones de conjugado de porfirina-fosfolípido.

## 10 ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

La administración de fármaco a tejidos diana puede ser tan importante como la administración de fármaco en sí. Se han desarrollado varios nanoportadores aprobados clínicamente para potenciar la biodistribución y la eficacia de ciertos fármacos. Sin embargo, dicha administración es obstruida mediante barreras fisiológicas y cinética de liberación, de manera que la biodistribución y la biodisponibilidad son casi inevitablemente subóptimas. Adicionalmente, la estabilidad de los nanoportadores en un entorno fisiológico también es importante. Actualmente los procedimientos más viables para la liberación de carga desencadenada externamente de nanoportadores comprenden sistemas que liberan su contenido cuando se aumentan las temperaturas circundantes unos pocos grados por encima de la temperatura corporal utilizando calentamiento directo o indirecto. Sin embargo, tales mecanismos no son fácilmente controlables para modulación de liberación desencadenante y la estrecha ventana operativa termal impide una alta estabilidad del portador a temperaturas fisiológicas y medio fisiológico. US2012/0253191 da a conocer nanovesículas que comprenden una bicapa de conjugado de porfirina-fosfolípido de al menos 15 % molar.

## 25 CARACTERÍSTICAS DE LA DIVULGACIÓN

De acuerdo con los aspectos de la invención, se proporcionan liposomas, nanoestructuras y composiciones para su uso de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona nanopartículas autoensambladas que comprenden conjugados de porfirina-fosfolípido (PoP). Las nanovesículas que comprenden conjugados de porfirina-fosfolípido, colesterol u otros lípidos de la presente divulgación - a las que también se refiere en el presente documento como liposomas de porfirina-fosfolípido ("liposomas de PoP") - se formulan para proporcionar alta eficiencia de: 1) colocación de carga, 2) retención de carga estable en suero en ausencia de radiación (650-1000 nm) infrarroja cercana (NIR) y 3) liberación controlada de carga al exponerse a radiación NIR.

En un aspecto, esta divulgación proporciona nanovesículas que comprenden una bicapa, comprendiendo dicha bicapa conjugados de porfirina-fosfolípido. En una realización de la divulgación, las bicapas de nanovesículas comprenden conjugado de porfirina-fosfolípido, fosfolípido, colesterol o análogos de los mismos. En una realización, la bicapa comprende conjugado de porfirina-fosfolípido, fosfolípido, colesterol y lípido-polietilenglicol. En una realización, la divulgación proporciona composiciones que comprenden las nanovesículas en un medio adecuado, tal como un tampón o una solución salina. En una realización, esta divulgación proporciona nanovesículas en las que la bicapa de las nanovesículas comprende porfirina-lípido, fosfolípido, colesterol o análogos de los mismos y, opcionalmente, polietilenglicol. Las nanovesículas pueden estar presentes en un tampón o una solución salina y las nanovesículas pueden comprender una carga (tal como terapéutica, diana o diagnóstica o cualquier otro agente).

En un aspecto la divulgación da a conocer los procedimientos para cargar las nanovesículas con carga deseada y los procedimientos para administrar carga *in vitro* o *in vivo* de una manera controlada espacial y temporalmente.

Se usan las siguientes abreviaciones en la divulgación:

50 DSPC: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

Dox: Doxorubicina

IRT: irinotecán

PoP: Conjugado de porfirina-fosfolípido (al que también se refiere en el presente documento como porfirina-fosfolípido)

55 Conjugado piro-fosfolípido (al que también se refiere en el presente documento como piro-fosfolípido): Un tipo de conjugado de porfirina-fosfolípido que puede ser generado mediante una reacción de esterificación entre lisofosfatidilcolina y pirofeoforbida.

Liposomas de PoP: liposomas dopados con porfirina-fosfolípido (PoP) (a los que también se refiere en el presente documento como nanovesículas)

Lípido PEG2K: Lípido PEG, 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000]

60 DMPC: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DOPC: 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

DPPC: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina

HSPC: L- $\alpha$ -fosfatidilcolina, hidrogenada (Soy)

DSPE: 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina

65 DPPA: 1,2-dihexadecanoil-*sn*-glicero-3-fosfato (sal sódica)

DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (sal de cloruro)  
 DSPG: 1,2-diesteroil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1'-*rac*-glicerol) (sal sódica)

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5
- Figura 1. Colesterol permite la carga de Dox en liposomas de PoP. A) Eficiencia de carga activa de Dox en liposomas de PoP con una proporción molar de carga Dox a lípido de 1:8. 5 % molar de lípido PEG se incluyó de manera conjunta con las cantidades indicadas de colesterol y piro-fosfolípido y DSPC completó la formulación. B) Eficiencia de carga activa de Dox en liposomas con o sin piro-fosfolípido 2 % molar. La proporción molar de carga Dox a lípido fue de 1:5. Los valores muestran media +/- S.D. para n=3. C) Micrografías crio-electrónicas de liposomas Dox-PoP formadas con una proporción molar DSPC:CHOL:PEG-lípido:PoP de 53:40:5:2 y una proporción de carga de Dox a lípido de 1:5. Las imágenes se recogieron con desenfoque que oscila entre -7 y -8 micras de defocus. Las flechas indican precipitado de Dox con los liposomas. Se muestra una barra de escala de 100 nm. D) Eficiencia de carga de liposomas Piro tiene una disminución drástica en la proporción de carga de fármaco a lípido de 0,2, mientras que la eficiencia de carga de liposomas libres de piro disminuye gradualmente.
- 10
- Figura 2. Efecto de concentración de PoP sobre la velocidad de liberación de Dox desencadenada por luz. A) Liberación de Dox en tiempo real de liposomas de PoP durante radiación láser de 665 nm con cantidades variables de Piro-fosfolípido incorporado. La liberación no detectable se produce sin radiación láser. B) Tiempo de irradiación láser requerido para liposomas de PoP para liberar 50% de la carga Dox. C) Velocidad de liberación de Dox inducida por luz para liposomas de PoP. D) Velocidad de liberación de Dox inducida por luz normalizada por la cantidad de Piro-fosfolípido. Los datos muestran media +/- Desviación Estándar (S.D.) para n=3. Todas las medidas se registraron en suero bovino al 50 % a 37°C.
- 15
- Figura 3. Colesterol y DSPE-PEG-2K ralentizan la liberación desencadenada por luz de los liposomas de PoP. A) Liberación de Dox en tiempo real durante radiación láser de 665 nm de liposomas de PoP que contiene Piro-fosfolípido al 2 % molar con cantidades variables de colesterol. El tiempo de radiación láser requerido para liposomas de PoP para liberar 50% de Dox cargado en función de B) Colesterol o C) DSPE-PEG-2K incorporados. Las medidas de liberación desencadenada por luz se registraron en suero bovino al 50% a 37°C. D) Eficiencia de carga activa de Dox en liposomas fabricada con cantidades variables de DSPE-PEG-2K utilizando una proporción molar de Dox a lípido de 1:5. Todos los datos muestran media +/-S.D. para n=3.
- 20
- Figura 4. Las proporciones de carga Dox a lípido no tienen efecto sobre velocidades de liberación desencadenada por luz de liposomas ocultos de PoP o estabilidad de suero *in vitro*. Los liposomas ocultos de PoP se formaron con DSPC:CHOL:DSPE-PEG-2K:PoP con proporciones molares de 53:40:5:2. A) Eficiencia de carga activa de Dox en liposomas con o sin Piro-fosfolípido 2 % molar en proporciones variables molares de fármaco a lípido. B) Tiempo de radiación láser requerido para liposomas ocultos de PoP para liberar el 50% de carga Dox como una función de proporción molar de Dox a lípido. C) Estabilidad en suero de liposomas de PoP ocultos cargados a proporciones molares indicadas de Dox a lípido en suero bovino al 50%, incubado a 37°C durante 4 horas. Media +/-S.D., n=3.
- 25
- Figura 5. Estabilidad de almacenamiento de liposomas de PoP ocultos cargados con Dox. Los liposomas se almacenaron a 4°C. A) Retención de Dox; B) Tamaño de liposoma; y C) polidispersidad de liposoma. D) Estabilidad en suero *in vitro* de Dox cargado después de 6 horas de incubación a 37°C en suero bovino al 50 %. E) Tiempo de irradiación láser necesario para liberar el 50% de Dox cargado en suero bovino al 50 % a 37°C. Los datos muestran media +/- S.D. para n=3 lotes de liposomas preparados por separado.
- 30
- Figura 6. Circulación sanguínea larga de Dox cargado en liposomas de PoP ocultos. Concentración en suero de Dox cargado en liposomas indicadas y administración intravenosa a ratones CD-1. Los valores muestran la media +/- S.D. para n = 4-5 ratones por grupo.
- 35
- Figura 7. Deposición de Dox mejorada inducida con láser de liposomas de PoP ocultos en un modelo tumoral dual de MIA Paca-2 contralateral. 1 hora después de inyección intravenosa de liposomas de PoP ocultos cargados con Dox, se irradiaron tumores solamente en un costado de ratones con un láser de 665 nm. Inmediatamente después de radiación, los ratones se sacrificaron y se determinó la concentración de Dox en ambos tumores tratados y no tratados. A) Efecto de dosis inyectada de Dox de 5 mg/kg o 10 mg/kg en liposomas de PoP ocultos. Los tumores se trataron con 30 minutos de radiación de 665 nm a 350 mW/cm<sup>2</sup>. B) Efecto de diferentes tiempos de radiación de 15 o 30 minutos. Los ratones se inyectaron con Dox de 10 mg/kg en liposomas de PoP ocultos y los tumores se trataron con radiación de 665 nm a 350 mW/cm<sup>2</sup>. No existió diferencia significativa entre radiación de 15 y 30 minutos en términos de absorción tumoral por Dox. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando post-test de Bonferroni, ANOVA de doble vía, \*P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\*P<0,001. Media +/- S.D. para n=4 tumores por grupo.
- 40
- Figura 8. La temperatura de superficie de tumor y el flujo sanguíneo durante fototratamiento con liposomas de PoP ocultos. A) Temperatura de superficie de xenoinjerto de MIA Paca-2 durante tratamiento con un diodo láser de 665 nm con potencia indicada una hora después de la administración intravenosa de liposomas de PoP con la dosis indicada de Dox. B) Cambios relativos en el flujo sanguíneo tumoral inducidos mediante el tratamiento láser en sí. El láser se cambió a la tasa de fluencia señalada como se indicó. C, D) Cambios relativos en el flujo sanguíneo tumoral como una función de tiempo (C) o una fluencia acumulativa (D) para ratones una hora después de la administración intravenosa de liposomas de PoP ocultos a las tasas de fluencia láser indicadas. Los valores indican media con S.D. (en una dirección vertical única para los datos de flujo sanguíneo) para n = 3-4 ratones por grupo.
- 45
- Figura 9. La eficacia de fototratamiento de liposomas de PoP ocultos cargados con Dox. Ratones desnudos con tumores de MIA Paca-2 se trataron cuando el diámetro de tumor alcanzó 4-5 mm y se sacrificaron cuando el volumen de tumor se incrementó 10 veces. Los tratamientos con láser implicaron la administración de luz de 665 nm de 300 J/cm<sup>2</sup> (300 mW/cm<sup>2</sup> a lo largo de 16,7 minutos). A) Eficacia sinérgica de liposomas de PoP ocultos de Dox con
- 50
- 55
- 60
- 65

tratamiento láser. Dox se administró con 7 mg/kg o con una dosis equivalente en grupos de control. B) Respuesta a la dosis de liposomas de PoP ocultos cargados con Dox con fototratamiento. Las dosis examinadas de 3, 5, 7 mg/kg fueran más efectivas de manera significativa que grupos de control no tratados ( $P < 0,05$ ). C) Masa corporal de ratones que fueron fototratados con liposomas de PoP ocultos cargados con Dox. D) Liposomas de PoP ocultos cargados con Dox con fototratamiento fueran más efectivos de manera significativa que tratamientos antitumorales convencionales incluyendo SSL Dox y Dox libre en sus dosis máximas toleradas (MTD) o PDT convencional que utiliza HPPH con el mismo tratamiento de luz y una dosis de fotosensibilizador equivalente ( $P < 0,05$ ). E) Crecimiento de volumen tumoral para grupos indicados de tratamiento. Media  $\pm$  S.E. para  $n = 5-6$  ratones por grupo.

Figura 10. La estructura de liposomas de PoP vacíos. Micrografías crio-electrónicas de liposomas Dox-PoP formados con una proporción molar DSPC:CHOL:PEG-lípido:PoP de 53:40:5:2. La barra de escala indica 100 nm.

Figura 11. Piro-fosfolípido, pero no HPPH-lípido, permite buena estabilidad en suero y rápida liberación de fármaco desencadenada por luz. Representaciones a tiempo real de liposomas de PoP que liberan Dox fabricados con liposomas que contienen HPPH-lípido al 2% y 35% de colesterol, 2% de HPPH-lípido y 40% de colesterol o 2% de Piro-fosfolípido y 40% de colesterol. Todos los liposomas se incubaron durante 1 h en suero bovino maduro al 50% y la radiación láser empezó a 1 hora. Todos los liposomas contenían 5 % molar de DSPE-PEG-2K y se cargaron a una proporción molar de fármaco a lípido de 1:5.

Figura 12. 2% de HPPH-lípido es óptimo para liberación rápida de Dox cargada. Se utilizaron 35 % molar de colesterol y 5% molar de DSPE-PEG- 2K (Proporción de fármaco a lípido de 1:8) para todas las formulaciones. A) Los perfiles de liberación de liposomas de HPPH con cantidades variables de HPPH cargadas con doxorubicina bajo irradiación láser. B) Tiempo requerido para alcanzar el 50% de liberación de doxorubicina para liposomas de HPPH con cantidades variables de HPPH-lípido. Mean  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .

Figura 13. Liberación rápida desencadenada por luz de NIR en suero utilizando liposomas de PoP ocultos cargadas con Dox A) Comparación de la velocidad de liberación inducida por láser de NIR de formulaciones nuevas (2% de Piro-fosfolípido) y descritas anteriormente (10% de HPPH-lípido) de liposomas de PoP. B) Tiempo necesario para alcanzar el 50% de liberación de Dox para formulaciones de liposomas anteriores (10% de HPPH-lípido) y de liposomas de PoP ocultos (2% Piro-fosfolípido). Las formulaciones anteriores utilizaron 10% de HPPH-lípido, 35% de Colesterol, la proporción de carga de fármaco a lípido de 1:8 mientras que la formulación de liposoma de PoP oculta consiste en 2% de Piro-fosfolípido, 40% de Colesterol, la proporción de carga de fármaco a lípido de 1:5. Media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .

Figura 14. 5% de PEG-lípido mantiene la velocidad de liberación rápida y la eficiencia de carga alta. Tiempo necesario para el 50% de liberación de liposomas con 2% de Piro-fosfolípido 45% de colesterol con 3%, 5% y 8% de PEG-lípido en suero bovino maduro filtrado al 50% a 37°C (A); Eficiencia de carga de liposomas fabricados con 0%, 1%, 3%, 5% y 8% de PEG-lípido, 45% de Colesterol (B). Media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .

Figura 15. Varios lípidos de fosfatidilcolina (PC) que incluyen DSPC, DPPC, HSPC y DOPC se pueden utilizar para liberación de liposomas Piro mientras se mantiene la estabilidad en suero. Se probaron tamaños de liposomas Piro cargados con doxorubicina fabricados con 53 % molar de DSPC, DPPC, HSPC y DOPC en PBS (A); Se probó el potencial Zeta de liposomas Piro fabricados con 53 % molar de DSPC, DPPC, HSPC y DOPC en H<sub>2</sub>O destilada (B); Liberación desencadenada en suero bovino maduro filtrado al 50% de liposomas Piro fabricados con 53 % molar de DSPC, DPPC, HSPC o DOPC (C). La estabilidad en suero bovino maduro filtrado al 50% a 37°C durante 4 h (D). Todas las formulaciones se fabricaron con 53 % molar de DSPC, DPPC o HSPC o DOPC, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, proporción de carga de doxorubicina a lípido de 1:8.

Figura 16. Lípidos catiónicos DOTAP y Fosfatidiletanolamina (PE) y lípidos de ácido fosfatídico (PA) se pueden utilizar para liposomas Piro para liberación desencadenada por luz. Se probaron tamaños de liposomas Piro cargados con doxorubicina fabricados con 43 % molar de DOTAP, 53 % molar de DSPE o DPPA en PBS (A); Se probó el potencial Zeta de liposomas Piro fabricados con 43 % molar de DOTAP, 53 % molar de DSPE o DPPA en H<sub>2</sub>O destilada (B); Liberación desencadenada en suero bovino maduro filtrado al 50% de liposomas Piro fabricados con 43 % molar de DOTAP, 53 % molar de DSPE o DPPA (C). La estabilidad de liposomas Piro fabricados con 43 % molar de DOTAP, 53 % molar de DSPE o DPPA en suero bovino maduro filtrado al 50% a 37°C durante 4 h (D). Los liposomas que contienen SDPE o DPPA se fabrican con 53 molar de DSPE o DPPA, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, promedio de carga de doxorubicina a lípido de 1:8. Los liposomas que contienen lípidos catiónicos DOTAP se fabrican con 43 % molar de DSPC, 20 % molar de DOTAP, 35 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido.

Figura 17. Los lípidos PC, Fosfatidilglicerol (PG), PA y PE se pueden usar para liposomas Piro para liberación desencadenada por luz. Se probaron tamaños de liposomas Piro cargados con irinotecán (IRT) fabricados con 53 % molar de DMPC, DSPG, DPPA o DSPE en PBS (A); Se probó el potencial Zeta de liposomas Piro fabricados con 53 % molar de DMPC, DSPG, DPPA o DSPE en H<sub>2</sub>O destilada (B); Liberación desencadenada en suero bovino maduro filtrado al 50% de liposomas Piro fabricados con 53 % molar de DMPC, DSPG, DPPA o DSPE (C). Todas las formulaciones se fabrican con 53 % molar de DMPC, DSPG, DPPA o DSPE, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, proporción de carga de irinotecán a lípido de 1:8.

Figura 18. Se pueden usar Colesterol, Colestanol, Sitosterol y Estigmasterol para formar liposomas Piro. Se probaron tamaños de liposomas Piro cargados con doxorubicina fabricados con 40 % molar de Colesterol, beta-Colestanol, Sitosterol o Estigmasterol en PBS (A); Se probó el potencial Zeta de liposomas Piro fabricados con 40 % molar de Colesterol, beta-Colestanol, Sitosterol o Estigmasterol en H<sub>2</sub>O destilada (B); Liberación desencadenada en suero bovino maduro filtrado al 50% de liposomas Piro fabricados con 40 % molar de Colesterol, beta-Colestanol, Sitosterol o Estigmasterol (C). La estabilidad de liposomas Piro fabricados con 40 % molar de Colesterol, beta-Colestanol, Sitosterol o Estigmasterol en suero bovino maduro filtrado al 50% a 37°C durante 4h (D). Todas las formulaciones se

fabrican con 53 % molar de DSPC, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol, beta-Colestanol, Sitosterol o Estigmasterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, relación de carga de doxorubicina a lípido de 1:8.

Figura 19. Se puede cargar de manera activa doxorubicina, irinotecán y daunorubicina en liposomas Piro y liberar bajo irradiación con láser. Se probaron tamaños de liposomas Piro cargados con doxorubicina, irinotecán o daunorubicina en PBS (A); Se probó el potencial Zeta de liposomas Piro cargados con doxorubicina, irinotecán y daunorubicina en H<sub>2</sub>O destilada (B); Liberación desencadenada en suero bovino maduro filtrado al 50% de liposomas Piro cargados con doxorubicina, irinotecán o daunorubicina (C). La estabilidad de liposomas Piro cargados con doxorubicina, irinotecán o daunorubicina en suero bovino maduro filtrado al 50% a 37°C durante 4h (D). Las formulaciones de liposomas Piro cargados con Dox son 53 molar de DSPC, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, relación de carga de doxorubicina a lípido de 1:8. Las formulaciones de liposomas Piro cargadas con irinotecán son 50 % molar de Esfingomielina, 45 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido. Las formulaciones de liposomas Piro cargados con daunorubicina son 43 % molar de DSPC, 5 % molar de PEG2k, 50 % molar de Colesterol y 2% de Piro-fosfolípido La relación de carga de todos fármacos a lípidos es de 1:8.

Figura 20. Se puede utilizar piro lípido con longitud de cadena de acilo variable para formar liposomas piro. Se probaron tamaño de liposomas Piro cargadas con irinotecán (IRT) fabricados con lípido Piro con longitud de cadena de carbonos 14, 16 o 18 en PBS (A); Se probó Potencial Zeta de liposomas Piro fabricados con longitud variable de cadena de carbonos 14, 16 o 18 en H<sub>2</sub>O destilada (B); (C) Liberación desencadenada en 50% de suero bovino maduro filtrado de liposomas Piro fabricados con lípido Piro de longitud de cadena de carbonos 14, 16 o 18. (D) Liberación desencadenada por luz de liposomas Piro fabricados con lípido Piro de longitud de cadena de carbono 16 y 18 (promedio de carga de Dox a lípido de 1:8) en 50% de suero bovino maduro filtrado. Todas las formulaciones se fabrican con 53 % molar de DSPC, 5 % molar de PEG2k, 40 % molar de Colesterol y 2 % molar de Piro-fosfolípido, promedio de carga molar de irinotecán o doxorubicina a lípido de 1:8.

Figura 21. La liberación rápida desencadenada por luz de Dox en liposomas que contienen pequeñas cantidades de DOPC y PoP. (A) Liberación de Dox de liposomas de PoP (0,3 % molar de PoP) con varias cantidades de DOPC bajo irradiación en 310 mW/cm en 50% de suero bovino a 37°C. (B) Tiempo necesario para alcanzar el 50% de liberación de Dox de liposomas de PoP (0,3 % molar de PoP) con diferentes cantidades de DOPC. (C) Liberación de Dox inducida por suero después de 4 h (h = hora(s)) de incubación en suero bovino al 50% a 37°C. (D) Liberación de Dox de liposomas de PoP con diferentes cantidades de PoP (0,05 - 1 % molar) con irradiación láser (310 mW/cm<sup>2</sup>) en 50% de suero bovino a 37°C. (E) Cantidad de Dox liberada en 60 s para liposomas de PoP que contienen diferentes cantidades de PoP. Los datos se presentan como un promedio 6 S.D., n=3.

Figura 22. La liberación potenciada desencadenada por luz se relaciona con oxígeno singlete. (A) Generación de oxígeno singlete durante radiación (310 mW/cm<sup>2</sup>) de liposomas de PoP en PBS, PBS que contiene 5 mM de ascorbato de sodio o 25 mM de sulfito de sodio. Se informó de oxígeno singlete mediante la unidad de fluorescencia de SOSG (RFU). (B) Liberación de Dox bajo irradiación (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min (min = minuto(s)) se inhibió en PBS que contenía 5 mM de ascorbato de sodio a temperatura ambiente. (C) Liberación de Dox bajo irradiación (310 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min) se inhibió en PBS que contenía 25 mM de ascorbato de sodio a temperatura ambiente. (D) Perfiles de liberación de Dox de liposomas de PoP (0,1% de PoP, 5 % molar de lípidos no saturados, 40 % molar de colesterol y 54,9 % molar de DSPC) que contienen 18:1(*cis*)PC, 18:2(*cis*) PC, o 18:0-18:2 PC bajo irradiación (310 mW/cm<sup>2</sup>) en suero bovino al 50% a 37°C. (E) Tiempo necesario para liposomas de PoP (0,1% de Piro-fosfolípido, 5 % molar de lípidos no saturados, 40 % molar de colesterol y 54,9 % molar de DSPC) para alcanzar el 50% de liberación de Dox. Los datos se presentan como un promedio 6 S.D., n=3. Figura 23. Irradiación por luz de liposomas de PoP da como resultado a oxidación de DOPC. (A) Contenido de DOPC en liposomas de PoP antes y después de irradiación durante 4 min en 310 mW/cm<sup>2</sup>. (B) Nuevas especies de lípidos generadas después de irradiación (m/z: 850.5806). (C) Cinética de oxidación de DOPC (% de DOPC presente comparado con muestras no irradiadas) mientras se irradia en 310 mW/cm<sup>2</sup>. Los datos se presentan como un promedio 6 S.D., n=3. (D) Estructura de DOPC y posible estructura de producto de DOPC oxidado (Masa exacta 850.5804, que corresponde a las especies oxidadas detectadas con m/z: 850.5806). (E) Esquema de oxidación de DOPC en liposomas de PoP utilizando oxígeno singlete que conduce a liberación de Dox.

Figura 24. Ascorbato inhibe oxidación de lípido desencadenada por luz. Liposomas de PoP se irradiaron con un láser de diodo de 665 nm durante 4 min en 310 mW/cm<sup>2</sup> en presencia o ausencia de 5 mM de ascorbato de sodio. Se normalizaron las señales en -láser sin ascorbato de sodio como 100%. (A) Se inhibió oxidación de DOPC mediante tratamiento por luz utilizando ascorbato de sodio. Generación inhibida de ascorbato de sodio de especies oxidadas relativas a DOPC (B) y relativas a colesterol (C) bajo irradiación. Los datos se presentan como una media ± S.D., n=3-3.

Figura 25. La permeabilización transitoria de liposomas de PoP que contienen DOPC bajo irradiación NIR. (A) Tamaño de liposomas de PoP con o sin irradiación láser (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min), medida en PBS. (B) Índice de polidispersidad (PDI) de liposomas de PoP con o sin irradiación láser (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min), medida en PBS. PDI se aumentó un poco, pero no de manera significativa (prueba unilateral de t). (C) Carga pasiva de calceína (presente como tasa de emisión de calceína/PoP) con adición de calceína anterior o posterior a la irradiación (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min). (D) Carga pasiva de calceína en liposomas vacías PoP pre-irradiados (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min). Calceína se añadió en periodos de tiempo indicados después de irradiación e incubación a temperatura ambiente. (E) Carga pasiva de calceína en liposomas vacías PoP pre-irradiados (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min). Se añadió calceína a liposomas vacías PoP inmediatamente después de irradiación e incubación a lo largo de varios periodos de tiempo a temperatura ambiente. Los datos se presentan como una media ± S.D., n=3.

Figura 26. La evaluación *in vivo* de liposomas de PoP que contienen DOPC de Dox cargados. (A) Farmacocinética de Dox en suero después de inyección intravenosa de liposomas Dox-PoP que contienen DOPC (10 mg/kg de Dox). Los

- datos muestran promedio  $\pm$ S.D.,  $n=4$ . (B) Absorción tumoral de Dox inmediatamente después de administración intravenosa y fototratamiento con liposomas Dox-PoP (6 mg/kg de Dox) con o sin irradiación láser (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 40 min). Se usó un modelo tumoral dual, con un tumor en un costado irradiado y el otro no irradiado como control de -láser. Los tumores irradiados tenían estadísticamente notablemente más absorción de Dox basada en el test t independiente (\*\*\*) $P<0,001$ . Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=4$ . (C) Curvas de supervivencia de Kaplan-Merier de ratones desnudos que llevan xenoinjertos de Mia Paca-2. Se administraron liposomas Dox-PoP a los ratones por la vía intravenosa (6 mg/kg de Dox, 0,25 mg/kg de PoP), liposomas vacíos PoP (0,25 mg/kg de PoP) o solución salina. 10 min después de la inyección, los ratones se irradiaron por luz (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 40 min, 600 J/cm<sup>2</sup>) como se indica. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 10 veces de su volumen inicial. (D) Volúmenes tumorales de ratones desnudos que llevan xenoinjertos de Mia Paca-2. Los ratones se inyectaron por la vía intravenosa con liposomas Dox-PoP con 2, 4, o 6 mg/kg de Dox o solución salina. 10 min después de la inyección, los tumores se irradiaron durante 40 min en 250 mW/cm<sup>2</sup>. Los datos se presentan como un promedio  $\pm$  S.D.,  $n= 5-6$ .
- Figura 27. DOPC ayuda a la carga de Dox de liposomas de PoP. DOPC ayuda a la carga de Dox en liposomas de PoP (2 % molar de PoP) que tienen deficiencia de PEG-lípido. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n= 2-3$ .
- Figura 28. La velocidad de liberación desencadenada por PEG-lípido tardío de liposomas de PoP que contienen DOPC. (A) Perfil de liberación desencadenada por luz de Dox de liposomas de PoP (0,1 % molar de PoP) con o sin PEG. (B) Tiempo necesario para alcanzar el 50 % de liberación de Dox de liposomas de PoP (0,1 % molar de PoP) con o sin PEG-lípido. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .
- Figura 29. Energía total necesaria para liberación de Dox depende de la tasa de fluencia aplicada. (A) Liberación de Dox bajo irradiación en diferentes tasas de fluencia en suero bovino al 50%. (B) Tiempo necesario para alcanzar el 90% de liberación de Dox en una función de tasa de fluencia. (C) Fluencia total necesaria para alcanzar el 90% de liberación de Dox en una función de tasa de fluencia. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .
- Figura 30. Se necesita la configuración *cis* de DOPC para potenciar la liberación por luz. (A) Perfiles de liberación de Dox de liposomas de PoP (0,3 % molar de PoP, 5 % molar de 18:1 (*trans*) PC o 18:1 (*cis*) PC) durante irradiación (310 mW/cm<sup>2</sup>) en suero bovino al 50% a 37°C. (B) Tiempo necesario para alcanzar el 50% de liberación de Dox de liposomas de PoP (0,3 % molar de PoP) que contienen 18:1 (*trans*) PC o 18:1(*cis*) PC. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .
- Figura 31. Generación de nuevas especies bajo irradiación. (A) Las especies oxidadas relativas a DOPC generadas en el transcurso de irradiación (310 mW/cm<sup>2</sup>). Se normalizaron las señales más altas (4 min de irradiación) como 100%. (B) Las especies oxidadas relativas a Colesterol generadas en el transcurso de irradiación (310 mW/cm<sup>2</sup>). Se normalizaron las señales más altas (4 min de irradiación) como 100%. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .
- Figura 32. La oxidación de colesterol lleva a liberación de carga de liposomas de PoP libres de DOPC. (A) Liposomas contenían 5 % molar de PEG-lípido, 5 % molar de PoP, 0% ó 40% de Colesterol y 90 % molar ó 50 % molar de DSPC, respectivamente. La liberación desencadenada por luz de sulfurodamina (SRB) cargada con liposomas de PoP se llevó a cabo en 250 mW/cm<sup>2</sup> en PBS a temperatura ambiente. (B) Inhibición de sulfito de permeabilización. Liposomas con contenido de 5 % molar de PEG-lípido, 5 % molar de PoP, 40% de Colesterol y 50 % molar de DSPC. La liberación desencadenada por luz se llevó a cabo en 250 mW/cm<sup>2</sup> en PBS o PBS que contenía 25 mM de sulfato de sodio a temperatura ambiente.
- Figura 33. La carga ineficiente de Dox en liposomas de PoP pre-irradiadas. La pre-irradiación de liposomas de PoP vacíos (2 mg/ml de lípidos) se llevó a cabo en 310 mW/cm<sup>2</sup> durante 4 min en 250 mM de solución de sulfato de amonio. Los liposomas de PoP pre-irradiados se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 min, seguido de diálisis para eliminar sulfato de amonio libre. La carga de Dox se realizó con un promedio de carga de fármaco a lípido de 1:8. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n=3$ .
- Figura 34. La caracterización y la estabilidad físicas de liposomas de PoP que contienen DOPC de Dox cargados. (A) Imagen de TEM de tinción negativa de liposomas cargadas con Dox. Se muestra una barra de escala de 200 nm. (B) Distribución de tamaño de liposomas cargadas con Dox, testados en PBS. (C) % de retención de Dox en liposomas de PoP (0,3 % molar de PoP) durante 3 meses almacenados a 4°C. (D) Tamaños de liposomas de PoP cargados con Dox a lo largo de 3 meses, testados en PBS. (E) Índice de polidispersidad (PDI) de liposomas de PoP cargados con Dox a lo largo de 3 meses, testados en PBS. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D., 3 lotes de liposomas preparadas independientemente.
- Figura 35. Los parámetros *in vivo* después de fototratamiento. (A) Biodistribución de liposomas de PoP cargados con Dox inmediatamente después de tratamiento láser. Peso corporal de ratón (B) de la Figura 6A y (C) la Figura 6B en 4 semanas. Los datos se presentan como una media  $\pm$  S.D.,  $n= 5-6$ .
- Figura 36. El desarrollo de liposomas de PoP en multicolor, multicanal. a) Estructura de piro-PoP y purpurina-PoP. b) Espectro de absorción en agua de liposomas de PoP indicadas. Se indica la longitud de onda de excitación por láser de laboratorio. c) Liberación de Dox de piro o purpurina-PoP bajo láser de 665 ó 695 nm.
- Figure 37. a) Adición de diferentes cantidades de Piro-fosfolípido a liposoma aumenta la liberación de una carga cargada pasivamente, el hidrófilo tinta SRB. b) Velocidad de liberación normalizada mediante la cantidad de piro-fosfolípido presente.
- Figura 38. Los liposomas de PoP (2 % molar de PoP) se cargaron simultáneamente con Gd-DTPA, SRB y oxaliplatino. Se eliminó la carga libre y los liposomas se inyectaron por vía intratumoral en ratones que tenían melanomas B16F10. Se utilizó fluorescencia SRB para 1) inyecciones de ejemplo y 2) demostrar la distribución dentro del tumor y 3) monitorizar la liberación. Se pretende a utilizar Gd-DTPA para contraste MR y oxaliplatino ejerce un efecto terapéutico. a) Liberación de Gd, PT y SRB desencadenados por irradiación láser de 665 nm como una función de tiempo. b)

Liberación de SRB en ausencia de luz NIR. c) Imágenes de ratón antes de inyección, inmediatamente después de inyección, 1 hora después de inyección y después de tratamiento por láser de 1 hora.

Figure 39. La carga y la liberación de fármaco. A) Piro-fosfolípido PoP se valoró en liposomas que consistían en DSPC:DSPE-PEG2000:Col (proporción molar de 60:5:35) reemplazando DSPC para comparar los efectos de piro-fosfolípido PoP contenido en carga de Dox e IRT. B) Liberación de Dox e IRT de liposomas que consisten en 2% de piro-fosfolípido bajo irradiación por láser de 665 nm.

Figure 40. Los efectos de fármaco en morfología de liposomas. Las imágenes de crio-TEM de IRT (A) y liposomas de PoP cargados con Dox (B) que consisten en DSPC:DSPE-PEG2000:Piro-fosfolípido:Col (58:5:2:35).

## 10 DESCRIPCIÓN DE LA DIVULGACIÓN

En la divulgación se dan a conocer nanovesículas de porfirina-fosfolípido de liberación controlada por luz estables en suero (liposomas de PoP), que tienen alta eficacia de carga. La liberación de carga de los liposomas de PoP se puede desencadenar directamente mediante luz infrarroja cercana (NIR), un estímulo aplicable clínicamente que tiene una actuación insignificante en el "estado apagado" y una interferencia mínima con tejidos biológicos circundantes.

La presente divulgación se basa en la observación sorprendente e inesperada que al incluir colesterol en la formulación de las nanovesículas, la eficiencia de carga de dichas vesículas se puede incrementar y se mejora la estabilidad de suero. Las nanovesículas de la presente divulgación comprenden porfirina-lípido, fosfolípidos, colesterol y, opcionalmente PEG-lípido. Las nanovesículas de la presente divulgación muestran carga estable, alta eficiencia de carga, estabilidad en suero y liberación controlada de carga.

En determinadas realizaciones, la bicapa de los liposomas de PoP de la presente divulgación comprende, consiste esencialmente en o consiste en conjugado de porfirina, fosfolípido, colesterol y, opcionalmente, PEG-lípido. En una realización, la bicapa de los liposomas de PoP presentes comprende conjugados de porfirina y lípidos, en donde los únicos lípidos - tanto conjugados con la porfirina o presentes como lípidos adicionales son fosfolípidos y esteroides.

En un aspecto, la divulgación proporciona una formulación de liposoma que comprende porfirina-fosfolípido y colesterol y otros componentes de lípido, que es capaz de 1) liberación rápida de contenidos en respuesta a exposición a luz infrarroja cercana (NIR); 2) carga activa de fármacos en los liposomas; 3) ser estable en suero (por ejemplo, durante 6 horas con menos del 20 % de pérdida de fármaco) en ausencia de exposición a láser. Una característica de las formulaciones presentes es que minimiza la cantidad de PoP en los liposomas de PoP con carga (Liposomas de PoP cargadas) mientras mantiene la estabilidad en suero y las propiedades de liberación rápida. Esto es ventajoso ya que las cantidades aumentadas de componentes de fotosensibilizador implican potenciales efectos secundarios para pacientes (por ejemplo, sensibilidad a la luz solar).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona nanovesículas y composiciones que comprenden nanovesículas. La bicapa de las nanovesículas comprende conjugados de porfirina. El conjugado de porfirina que constituye una parte o toda la bicapa de las nanovesículas comprende porfirinas, derivados de porfirina, análogos de porfirina o combinaciones de los mismos. Las porfirinas de ejemplo incluyen hematoporfirina, protoporfirina y tetrafenilporfirina. Los derivados de porfirina de ejemplo incluyen pirofeoforbidas, bacterioclorofilas, Clorofila A, derivados de benzoporfirina, clorinas de tetrahidroxifenilo, purpurinas, benzoclorinas, naftoclorinas, verdinas, rodinas, cetoclorinas, azoclorinas, bacterioclorinas, toliporfirinas y benzobacterioclorinas. Los análogos de porfirina de ejemplo incluyen miembros de familia de porfirina expandidos (tales como texafirinas, sapfirinas y hexafirinas) e isómeros de porfirina (tales como porfícenos, porfirinas invertidas, ftalocianinas y naftalocianinas).

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

Tal como se usa en el presente documento, "fosfolípido" es un lípido que tiene un grupo de cabeza hidrofílico que tiene un grupo fosfato conectado a través de un núcleo de glicerol a una cola lipídica hidrofóbica. El fosfolípido comprende una cadena lateral de acilo de 6 a 22 carbonos, que incluye todos los números enteros de carbonos e intervalos entremedio. En determinadas realizaciones, el fosfolípido en el conjugado de porfirina es 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfolina. El fosfolípido en el conjugado de porfirina puede comprender o consistir esencialmente en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y/o fosfatidilinositol.

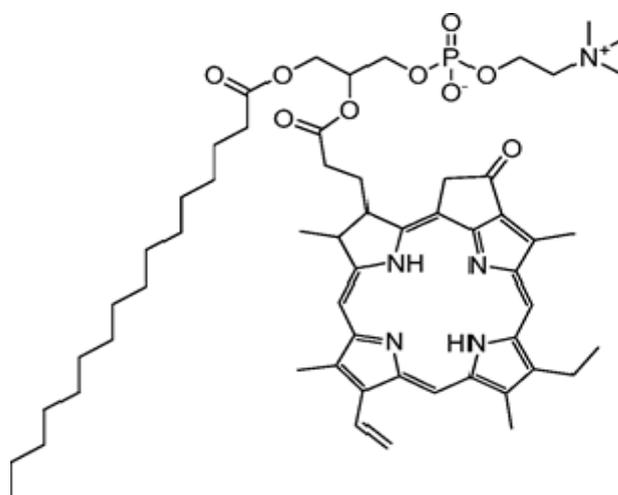
En determinadas realizaciones, la bicapa de las nanovesículas autoensambladas comprende además PEG-lípido. El PEG-lípido puede ser DSPE-PEG, tal como DSPE-PEG-2000, DSPE-PEG-5000 u otros tamaños de DSPE-PEG. El PEG-lípido está presente en una cantidad de 0,5 a 8 % molar que incluye todas las cantidades en porcentaje entremedio hasta el décimo punto decimal. En una realización, el PEG-lípido está presente de 4-6 % molar. En una realización, está presente aproximadamente 5% (4,8 a 5,2 % molar). El peso molecular promedio del resto de PEG puede ser entre 500 y 5000 Dalton y todos los valores enteros e intervalos entremedio. En una realización el peso molecular del resto de PEG es de 2000 Dalton.

En distintas realizaciones, además de los conjugados de porfirina divulgados en el presente documento, la bicapa de las nanovesículas comprende también otros lípidos polares. Las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos de las

composiciones presentes pueden contener un número adecuado de átomos de carbono para formar bicapa. Por ejemplo, la cadena de ácidos grasos puede contener 12, 14, 16, 18, 20 o 22 átomos de carbono. En diferentes realizaciones, la bicapa puede comprender fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y/o lípidos catiónicos. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, DSPC, DPPC, DMPC, HSPC, DSPG, DPPA, DSPE, DOTAP, esfingomiolina y similares.

La bicapa de las nanovesículas de la divulgación también comprende esteroides. Los esteroides pueden ser esteroides de origen animal o esteroides de origen vegetal. Los ejemplos de esteroides incluyen colesterol, sitosterol, estigmasterol y colestanol. Por ejemplo, el colesterol puede ser más del 30 % molar. En una realización, es de 35 a 50 % molar y todos los enteros entremedio. En una realización, el colesterol es aproximadamente 45% (43 a 47 % molar). En una realización, es 40, 41, 42, 43, 44, ó 45 % molar. El uso del monómero de liposomas de PoP de la presente divulgación permitió la carga efectiva de carga en nanovesículas y el uso de NIR leve dio como resultado la liberación de carga rápida y hasta el 100%.

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un conjugado de porfirina-fosfolípido que tiene la siguiente estructura:



Piro-fosfolípido (Estructura I)

En una realización, el % molar de los compuestos de conjugado de porfirina-fosfolípido de nanovesículas de la presente divulgación es de 0,1 a 5. En una realización, la bicapa de liposoma-PoP está constituida de 0,5 a 8 % molar. En una realización, la bicapa de liposoma de PoP comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 % molar. En una realización, los liposomas de PoP comprenden todos los porcentajes molares hasta la décima cifra decimal entre 0,1 y 8,0.

En una realización, las presentes composiciones comprenden nanovesículas, en las que las nanovesículas comprenden una bicapa, donde la bicapa comprende de 45 a 61,5 % molar de fosfolípido, de 0,5 a 8% de conjugado de porfirina, de 35 a 45% de esteroles y, opcionalmente, de 1 a 6 % molar de PEG-lípido. En una realización, el conjugado de porfirina, esteroles y, opcionalmente, PEG-lípido, PEG se añade en cantidades deseadas y, a continuación, el resto está constituido con fosfolípido. En una realización, la bicapa comprende de 0,5 a 8% de piro-fosfolípido, de 35 a 45% de colesterol y, opcionalmente, de 1 a 6 % molar de PEG-lípido y el resto está constituido con un fosfolípido (tal como DSPC).

Las nanovesículas de la presente divulgación pueden tener de 0,1 a 5 % molar de piro-fosfolípido, de 30 a 50% de esteroles, opcionalmente, PEG-lípido y fosfolípido restante (que no es piro-fosfolípido). Por ejemplo, las nanovesículas pueden tener 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 ó 5,0 % molar de piro-fosfolípido, 30-50 % molar de colesterol, opcionalmente, 1-6 % molar de PEG-lípido y fosfolípido restante. Los fosfolípidos pueden ser cualquier fosfolípido. Por ejemplo, los fosfolípidos pueden ser DSPC. Los fosfolípidos pueden ser DOPC y DSPC. En un ejemplo, DSPC y DOPC están presentes y DOPC está presente de 1 a 10 % molar. Por ejemplo, las nanovesículas pueden tener de 0,1 a 5 % molar de piro-fosfolípido, de 30 a 50% de colesterol, opcionalmente, de 1-6 % molar de PEG-lípido, de 0,1 a 10% molar de DOPC y DSPC restante. Se puede reemplazar una fracción de DSPC por otros fosfolípidos (por ejemplo, fosfolípidos saturados, insaturados o parcialmente insaturados) o lípidos (por ejemplo, esfingomiolina). Se encontró que las formulaciones mostraban liberación deseada de carga (por ejemplo, 90% o más de liberación después de 2 minutos de radiación con un láser en 350 mW/cm<sup>2</sup>) cuando se irradiaban con luz NIR. Para alcanzar una estabilidad en suero mejorada a temperaturas fisiológicas, DOPC

puede ser menor de 7 % molar. Por ejemplo, DOPC puede ser de 0,1 a 6,5 % molar, tal como de 0,1 a 6,0 % molar ó 0,1 a 5 % molar.

5 Los fosfolípidos (es decir, fosfolípidos libres que no se conjugan con una porfirina) pueden tener dos cadenas de alquilo saturado (por ejemplo, fosfolípidos saturados tales como, por ejemplo, DSPC) o dos cadenas de alquilo insaturado (por ejemplo, fosfolípidos insaturados tales como, por ejemplo, DOPC y DLPC) o una cadena de alquilo saturado y una cadena de alquilo insaturado (por ejemplo, fosfolípidos parcialmente insaturados). Los fosfolípidos insaturados pueden tener al menos uno o todos enlaces dobles en *cis* carbono-carbono. Los fosfolípidos pueden ser una mezcla de fosfolípido(s) saturado(s), fosfolípido(s) insaturado(s) y/o fosfolípido(s) parcialmente insaturado(s). El fosfolípido insaturado puede ser de 0,1 % molar a 10 % molar de la nanovesícula. Por ejemplo, el fosfolípido insaturado puede ser de 0,1 % molar a 6,5 % molar de la nanovesícula. En un ejemplo, las nanovesículas comprenden un fosfolípido insaturado que es x % molar, un fosfolípido saturado que es y-x % molar (en donde y = 45 a 61 % molar, tal como, por ejemplo, de 59 a 60 % molar y todos los valores hasta la décima cifra decimal entremedio), esterol es de 30 a 50 % molar y conjugado de porfirina es de 0,1 a 5 % molar (tal como, por ejemplo, 0,1 a 1,0 % molar). En un ejemplo, las nanovesículas comprenden DOPC que es x % molar, DSPC que es y-x % molar (donde y = 45 a 61 % molar, tal como, por ejemplo, de 45 a 60, 59 a 61 o de 59 a 60 % molar y todos los valores hasta la décima cifra decimal entremedio), colesterol es de 30 a 50 % molar y piro-fosfolípido es de 0,1 a 5 % molar (tal como, por ejemplo, de 0,1 a 1,0 % molar). Por ejemplo, las nanovesículas pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en de 0,1 a 1,0 % molar de piro-fosfolípido, de 35 a 45 % molar de colesterol, de 0,1 a 5 % molar de DOPC y el resto es DSPC.

25 Las nanovesículas son sustancialmente esféricas antes de añadir la carga (por ejemplo, fármaco). Las nanovesículas pueden ser no esféricas después de añadir la carga (por ejemplo, fármaco). Las nanovesículas (cargadas o no cargadas) pueden tener un tamaño (por ejemplo, una dimensión más larga) desde 50 nm hasta 250 nm de diámetro y todos los enteros hasta el nm y los intervalos entremedio. En una realización, el tamaño de las nanovesículas es de 75-175 nm. En una realización, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ó 100% de las nanovesículas en la composición tienen un tamaño de 50 a 250 nm, de 75 a 175 nm o de 80-100 nm. En una realización, dichos tamaños se observan en PBS.

30 Una composición puede comprender una o más nanovesículas en un portador. Por ejemplo, una composición comprende además un portador. El portador puede ser un portador acuoso adecuado para su administración a individuos incluidos los humanos. El portador puede ser estéril. El portador puede ser un tampón fisiológico. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen sacarosa, dextrosa, solución salina y/o un elemento de tampón de pH (tal como, un elemento de tampón que regula, por ejemplo, un pH desde pH 5 a 9, desde pH 6 a 8, (por ejemplo, 6,5)) tal como, histidina, citrato o fosfato.

40 En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende nanovesículas de la presente divulgación y un portador estéril adecuado para la administración a individuos incluidos los humanos - tal como un tampón fisiológico, tal como sacarosa, dextrosa, solución salina, elemento que regula pH (tal como desde pH 5 a 9, desde pH 7 a 8, desde pH 7,2 a 7,6 (por ejemplo, 7,4)), tal como histidina, citrato o fosfato. En una realización, la composición comprende al menos 0,1% (p/v) de liposomas de PoP de la presente divulgación. En diferentes realizaciones, la composición comprende de 0,1 a 100 % de liposomas de PoP. Una parte de la molécula agente (carga) puede estar integrada en la bicapa.

45 En un aspecto de la divulgación, los liposomas de PoP presentes pueden proporcionarse en un medio o portadores basados en suero. Por lo tanto, por ejemplo, los liposomas de PoP pueden presentarse en suero diluido, concentrado o no diluido.

50 Las formulaciones de liposomas de PoP pueden incubarse en tampones, incluyendo tampones fisiológicos o medios que contienen suero durante periodos de tiempo de 4 a 24 horas a temperaturas fisiológicas (por ejemplo, 37°C) sin liberar la mayoría de su carga. En varios ejemplos, las formulaciones de liposomas de PoP pueden incubarse en tampones o medios que contienen suero durante periodos de tiempo de 4 a 24 horas a temperaturas fisiológicas (por ejemplo, 37°C) sin liberar 60% o más, 70% o más, 80% o más o 90% o más de su carga.

55 Las nanovesículas son estables en suero diluido (por ejemplo, 50% en peso de suero y 50% en peso de tampón acuoso) o no diluido. En diferentes ejemplos, las nanovesículas liberan 20% o menos, 15% o menos o 10% o menos de su carga después de almacenamiento a temperaturas fisiológicas (por ejemplo, 37°C) durante 6 horas a 24 horas.

60 Se puede cargar una gran variedad de carga en las nanovesículas de la presente divulgación y se administran a localizaciones deseadas utilizando luz infrarroja cercana. Por ejemplo, agentes bioactivos o terapéuticos, agentes de diagnóstico, agentes diana, sustancias farmacéuticas y/o fármacos se pueden encapsular en la parte interna de liposomas de PoP. Esto incluye fármacos solubles en agua y también fármacos que son ácidos o bases débiles que se pueden cargar vía gradientes químicos y concentrarse en el núcleo acuoso de la nanovesícula. Por lo tanto, en diferentes realizaciones de la divulgación, la nanovesícula comprende un agente activo encapsulado en la misma, tal como un agente terapéutico o un agente diagnóstico, que puede ser un agente de quimioterapia, tal como doxorubicina. En una realización, el agente quimioterapéutico, doxorubicina y/o irinotecan, se puede cargar

activamente y liberar con radiación NIR, proporcionando una liberación desencadenada por luz firme y directa utilizando nanovesículas PoP.

Se puede añadir la carga de manera pasiva y puede ser, que incluye, pero no se limita a, obtención de imágenes hidrófilas y compuestos terapéuticos, tales como quelatos de gadolinio, tal como Gd-DTPA, colorantes de contraste fluorescentes, tales como ICG, SRB, o fluoresceína y fármacos cargados de manera pasiva, tales como cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, metotrexato, fosfato de prednisolona, gentamicina o proteínas terapéuticas y ácidos nucleicos terapéuticos. La carga puede ser una carga añadida de manera activa, tal como fármacos anfifílicos débiles, con restos de ácidos o básicos débiles que forman precipitados dentro de los liposomas e incluyen, pero no se limitan a, bupivacaína, epirubicina, daunorubicina, vinblastina, hidromorfona, vincristina, mitomicina C, dopamina, serotonina, epinefrina, codeína, meperidina, metadona, morfina, atropina, imipramina, amitriptilina, doxepina, desipramina, quinidina, naranja de acridina.

En una realización, el promedio de lípido a fármaco (o cualquier otro agente de carga) (en una base de mol) es de 10:1 a 5:1. En diferentes realizaciones, el promedio de lípido a fármaco/carga es de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, o 5:1. En una realización, el valor de lípido utilizado para dichas determinaciones tiene en cuenta todos los lípidos - incluyendo lípidos conjugados con porfirina, fosfolípido adicional, esterol y lípido conjugado con PEG (si está presente).

El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier resto químico que es una sustancia biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activa. Los ejemplos de agentes terapéuticos, a los que se refiere también como "fármacos", se describen en referencias literarias bien conocidas tales como el Índice Merck, the Physicians Desk Reference, y The Pharmacological Basis of Therapeutics, e incluyen, sin limitación, medicamentos; vitaminas; suplementos minerales; sustancias utilizadas para el tratamiento, prevención, diagnóstico, cura o mitigación de una enfermedad; sustancias que afectan la estructura o la función del cuerpo; o profármacos, que se convierten en biológicamente activos o más activos después de su colocación en un entorno fisiológico. Se pueden usar varias formas de un agente terapéutico que son capaces de ser liberados de la composición objetivo en tejidos o fluidos adyacentes al administrarlas a un sujeto. Los fármacos que se conocen que se pueden cargar vía gradientes activos incluyen doxorubicina, irinotecan, gemcitabina, epirubicina, topotecan, vincristina, mitoxantrona, ciprofloxacino, cisplatino y daunorubicina. Dichos fármacos se pueden cargar en y liberarse de liposomas de PoP. La carga terapéutica incluye también diferentes antibióticos (tal como gentamicina) u otros agentes efectivos contra infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos u otros organismos, agentes anti-inflamatorios o agentes antivirales.

Un "diagnóstico" o "agente de diagnóstico" es cualquier grupo químico que se puede usar para el diagnóstico. Por ejemplo, los agentes de diagnóstico incluyen agentes para obtención de imágenes, tales como aquellos que contienen radioisótopos, tales como indio o tecnecio; agentes de contraste que contienen yodo o quelatos de gadolinio.

En determinadas realizaciones, las nanovesículas comprenden además una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, péptido, aptámero o ácido fólico. "Molécula de reconocimiento" es cualquier molécula que puede dirigir las nanovesículas a una diana particular, por ejemplo, mediante unión a un receptor u otra molécula en la superficie de una célula diana. Las moléculas de reconocimiento pueden ser proteínas, péptidos, moléculas de ácido nucleico, sacáridos o polisacáridos, ligandos receptores u otras moléculas pequeñas. El nivel de especificidad se puede modular a través de la selección de la molécula de reconocimiento. Por ejemplo, los anticuerpos muestran típicamente una alta especificidad. Estos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos, recombinantes o de cadena única, muchos de los cuales están disponibles comercialmente u se obtienen fácilmente utilizando técnicas estándar.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de preparación de una nanovesícula que comprende mezclar un conjugado de porfirina-fosfolípido en tampón, en donde los conjugados de porfirina-fosfolípido son como se describen en el presente documento y extrudir la mezcla para producir una nanovesícula con bicapa de porfirina-fosfolípido que comprende una bicapa de la cantidad deseada del conjugado de porfirina-fosfolípido. Adicionalmente a porfirina-fosfolípido (tal como 2 % molar), se pueden incluir otros fosfolípidos o lípidos en la mezcla para producir los liposomas de PoP. Por ejemplo, en una realización, se puede utilizar DSPE-PEG-2K (por ejemplo, 5 % molar); colesterol (por ejemplo, 40 % molar) y lípido (por ejemplo, DSPC 53 % molar). Se puede preparar un conjugado de porfirina-fosfolípido mediante esterificación de un tetrapirrol que contiene ácido carboxílico en un liso-fosfolípido. Por ejemplo, Piro-fosfolípido se puede esterificar a temperatura ambiente con 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (liso-C16-PC), Avanti #855675P) utilizando EDC y 4-dimetilaminopiridina (DMAP, Fisher #AC14827-0250) en cloroformo con una proporción molar de liso-C16-PC:Piro:EDC:DMAP de 1:1:2:2.

En una realización, los liposomas de PoP se forman mediante la dispersión de porfirina-lípido, colesterol y otro lípido y, opcionalmente, componentes de PEG-lípido. Por ejemplo, en una realización, los liposomas Piro-fosfolípido se pueden preparar mediante disolución de DSPC, DSPE-PEG2K, Piro-fosfolípido y colesterol en un disolvente y calentamiento (tal como de 60 a 70°C). Se puede añadir a continuación sulfato de amonio o citrato de sodio tamponados a la mezcla de reacción mientras se mantiene la temperatura. Tras la formulación del liposoma, los liposomas se pueden extrudir bajo alta presión (tal como con membranas de policarbonato apiladas de manera secuencial) para alcanzar el tamaño de liposoma deseado. Los materiales iniciales residuales, tales como sulfato de amonio o citrato de sodio, se pueden eliminar (por ejemplo, mediante diálisis). La adición de la carga en las nanovesículas se puede llevar a cabo mediante la adición de la proporción deseada de la carga seguida de incubación.

Los tamaños y potencial zeta del liposoma, si se desea, se pueden determinar mediante técnicas de dispersión de luz. La eficiencia de carga se puede determinar pasando una solución de liposomas sobre una columna y cualificando el porcentaje de fármacos en las fracciones que contienen liposomas. Las cantidades de fármaco se pueden medir utilizando espectroscopia fluorescente. La liberación desencadenada por luz se puede conseguir utilizando un diodo láser. Si se desea, la liberación de carga se puede conseguir midiendo la liberación antes y después de la exposición a láser.

En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de administración de agentes contenidos como carga en las nanovesículas a las localizaciones deseadas. Aunque en ocasiones, la carga se describe como fármaco en la divulgación, la descripción es igualmente aplicable a cualquier agente comprendido para tratamiento y/o administración en una localización deseada, y el término "fármaco" se refiere a cualquier agente. El agente puede estar contenido, en su totalidad o en parte, dentro o en los liposomas de PoP - si está presente en el compartimento acuoso, la bicapa o ambos. De este modo, en otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de administración de carga de una nanovesícula que comprende las etapas de: 1) proporcionar una composición que comprende nanovesículas de la presente divulgación que comprenden la carga (tal como un agente activo); 2) permitir a las nanovesículas alcanzar un objetivo seleccionado o deseado; 3) irradiar las nanovesículas con radiación que tiene una longitud de onda de infrarrojo cercano bajo las condiciones tales que al menos una porción de la carga se libera de la nanovesícula.

El procedimiento de la presente divulgación se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. Cuando se realiza *in vivo*, en una realización, la irradiación con radiación infrarroja cercana es tal que la temperatura de los tejidos circundantes no aumenta más de 5, 6, 7, 8, 9 y 10, 11 y 12 grados centígrados. En diferentes realizaciones, la temperatura de los tejidos circundantes es menor de 5 grados centígrados. El procedimiento de la presente divulgación se puede usar en cualquier individuo de cualquier edad incluyendo los animales y los humanos.

Las nanovesículas se irradian con luz infrarroja cercana de un láser con potencia de 5 a 1000 mW/cm<sup>2</sup>, incluyendo todos los valores enteros hasta el mW/cm<sup>2</sup> y los intervalos entremedio, con una longitud de onda desde 650 hasta 1000 nm, incluyendo todos los valores enteros hasta los nm y los intervalos entremedio. En un ejemplo, la potencia es desde 10 hasta 350 mW/cm<sup>2</sup>. Por ejemplo, la potencia del láser puede ser desde 250 hasta 350 mW/cm<sup>2</sup> y la longitud de onda del láser puede ser desde 650 hasta 800 nm, o 655-675, o de 660 hasta 670 nm incluyendo todos los valores enteros hasta los nm y los intervalos entremedio.

La liberación de carga depende de la potencia de láser. En una realización, las presentes formulaciones en tampones fisiológicos o medios basados en suero a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) no muestran liberación detectable de carga en ausencia de un desencadenante por luz. Sin embargo, cuando la luz en la longitud de onda de 660-670 nm de un láser de 300 mW/cm<sup>2</sup> se aplica en las nanovesículas, se observa liberación inmediata de la carga. Se puede liberar al menos 90%, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de la carga desde los liposomas de PoP en un medio basado en suero a 37°C en 5 minutos de exposición a un láser de 300 mW/cm<sup>2</sup> que tiene una longitud de onda de aproximadamente 665 nm. Se puede observar tal liberación en 1, 2, 3, o 4 minutos. Si se usa un láser con mayor potencia, la liberación de la carga se alcanza más rápido. Sin embargo, 300 mW/cm<sup>2</sup> pueden considerarse aceptables clínicamente.

El alcance de liberación de carga también depende del tiempo de exposición. Generalmente, un tiempo de hasta 30 minutos o menos es suficiente. Se pueden irradiar las nanovesículas *in vitro* o *in vivo* de 0,5 a 30 minutos y todos los valores enteros hasta el décimo punto decimal entremedio. Por ejemplo, se pueden irradiar las nanovesículas con un diodo láser de 665 nm durante hasta 10 minutos. Variado la potencia de láser y/o el tiempo de láser, se consigue controlar cuanto fármaco se libera de las nanovesículas. Además, la irradiación controlada para alcanzar una estrategia de liberación por luz en «pequeños vasos únicamente» puede dar como resultado una liberación sistémica más baja de fármaco y no dañará vasos críticos en los órganos con vascularización extensiva (tal como el páncreas). La radiación infrarroja se puede administrar en el área deseada directamente proyectando luz láser en el área o se pueden utilizar sondas de fibra óptica. En el caso de un tumor, la sonda de fibra óptica se puede insertar en el tumor (es decir, vía un catéter o un dispositivo endoscópico) para proporcionar irradiación a una área localizada. Después de exposición a láser, se pueden liberar las nanovesículas. De este modo, la apertura y el cierre de las nanovesículas puede ser reversible.

Los procedimientos pueden usar nanovesículas cargadas con ambos agentes de obtención de imágenes y terapéuticos en el liposoma. Dichos liposomas se pueden administrar a un individuo (por ejemplo, inyectado a un tumor) y se pueden utilizar agentes de obtención de imágenes para verificar la localización de las nanovesículas y/o la distribución de tumor, y las nanovesículas pueden irradiar la liberación desencadenada de los agentes.

Los procedimientos pueden administrar de manera selectiva/secuencial dos o más cargas irradiando dos o más tipos de nanovesículas que tienen al menos un conjugado de porfirina diferente. Un ejemplo de administración selectiva/secuencial se describe en el Ejemplo 4. Por ejemplo, si los conjugados de porfirina individuales en las nanovesículas administradas tienen una absorción máxima que permite la liberación desencadenada de un tipo de nanovesícula sin liberación desencadenada detectable de otras nanovesículas. Por ejemplo, al menos dos nanovesículas diferentes con al menos un conjugado de porfirina diferente que tienen absorción máxima separada por

10 nm o más se pueden administrar de manera selectiva/secuencial irradiando las nanovesículas con luz con una longitud de onda que desencadena liberación de uno o más tipos de nanovesículas sin liberación desencadenante de más del 20% de la carga de al menos otro tipo de nanopartículas. En varios ejemplos, al menos dos nanovesículas con al menos un conjugado de porfirina diferente que tienen absorción máxima separadas por 15, 20, 25 ó 50 nm o más se pueden administrar de manera selectiva/secuencial irradiando las nanovesículas con luz con una longitud de onda que desencadena liberación de uno o más tipos de nanovesículas sin liberación desencadenante de más de 10, 5, 4, 3, 2, 1 ó 0,5 % de la carga de al menos otro tipo de nanopartículas. En un ejemplo, al menos dos nanovesículas con al menos un conjugado de porfirina diferente que tienen absorción máxima separadas por 10, 15, 20, 25 ó 50 nm o más se pueden administrar de manera selectiva/secuencial irradiando las nanovesículas con luz con una longitud de onda que desencadena liberación de uno o más tipos de nanovesículas sin liberación desencadenante de cualquier carga detectable de al menos otro tipo de nanopartículas. La liberación de carga se puede detectar utilizando los procedimientos conocidos en la técnica y los procedimientos descritos en el presente documento.

Una propiedad útil de las nanovesículas de la presente divulgación es que existe una liberación mínima (es decir, liberación de contenidos de menos del 5% por hora) del agente activo cuando se incubaba en un medio que contiene suero a 37°C hasta que se irradia la nanovesícula con una luz infrarroja cercana. En una realización, 100% del agente activo (carga) que se irradia en el tejido diana con suficiente potencia de láser se libera de la nanovesícula. Cuando el agente activo se libera *in vivo* de la nanovesícula, la temperatura del tejido circundante no aumenta de manera significativa. Seleccionando la intensidad de NIR aplicado, se puede controlar la cantidad de carga liberada en un punto determinado o en un tiempo determinado. De este modo, en cualquier punto entre 1 y 100% (y todos los números enteros entremedio) de la carga de las nanovesículas se puede liberar en puntos y tiempos deseados. En una realización, la liberación de la carga (en cualquier punto entre 1 y 100% de la carga) se alcanza en una o más etapas. Por ejemplo, se pueden utilizar pulsos de exposición a NIR en intervalos de tiempo deseados de tal modo que la carga se libera poco a poco.

La composición que comprende las nanovesículas en un portador adecuado se puede administrar a los individuos de cualquier modo adecuado. En una realización, se administra vía infusión intravenosa de tal modo que entrará en la vasculatura (sistema circulatorio). Se puede administrar la composición de manera sistemática o se puede administrar directamente en el riego sanguíneo para un órgano o tejido o tumor particulares. Cuando se irradia con NIR, los contenidos de los liposomas de PoP se pueden liberar en el sistema circulatorio y, a continuación, pueden entrar en el tejido circundante. En determinadas realizaciones, los liposomas de PoP se pueden administrar directamente al tejido relevante.

Adicionalmente, la estabilidad en suero de los liposomas de PoP permite opciones de tiempo más largos para liberación desencadenada (sistemas de administración menos estables deben desencadenarse inmediatamente después de la administración).

En una realización, la presente divulgación proporciona una nanovesícula que comprende una bicapa de al menos 0,5 % molar a 8 % molar de un conjugado de porfirina-fosfolípido y todos los porcentajes hasta el décimo punto decimal entremedio. En realizaciones específicas, las nanovesículas comprenden de 1 a 8 % molar, de 0,5 a 5,0 % molar, de 0,5 a 3 % molar, de 1 a 3 % molar, aproximadamente 2 % molar (de 1,5 a 2,5 % molar) y 2 % molar de conjugado de porfirina-fosfolípido, en donde el conjugado de porfirina-fosfolípido puede ser la estructura de Piro-fosfolípido. En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden las nanovesículas en un portador aceptable. En otra realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento de administración de un agente a un sitio deseado que comprende las etapas de: cargar el agente como una carga en los liposomas de PoP de la presente divulgación, administrar los liposomas de PoP a un individuo, causando la liberación de la carga (agente) en sitios deseados proyectando radiación de luz infrarroja cercana mientras las nanovesículas pasan por vasculatura en el sitio deseado de tal modo que la carga de las nanovesículas se libera. En una realización, tras la irradiación de la radiación NIR, la liberación de la carga (agente) se puede conseguir cuando las nanovesículas se mueven por los vasos sanguíneos pequeños (tales como capilares). De este modo, la liberación de fármaco se puede confinar solamente a vasos más pequeños en los tejidos diana y no a vasos sanguíneos más grandes cercanos.

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar la presente divulgación. No pretenden ser limitantes de ningún modo.

## EJEMPLO 1

Este ejemplo describe la preparación de liposomas de PoP y la carga y la liberación de carga.

Materiales y Procedimientos. Preparación de liposomas de PoP. A menos que se indique lo contrario, los lípidos se obtuvieron de Avanti y otros materiales se obtuvieron de Sigma. HPPH-lípido y Piro-fosfolípido se sintetizaron como se informó previamente. Diferentes formulaciones de liposoma se realizaron utilizando el mismo procedimiento. La formulación finalizada de liposoma de PoP oculta incluía 53 % molar de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, Avanti #850365P), 40 % molar de colesterol (Avanti #700000P), 2 % molar de Piro-fosfolípido y 5 % molar de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000 (DSPE-PEG-2K, Avanti #880120P). Para generar 100 mg de liposomas de PoP (un lote de 5 mL), se disolvieron completamente 57,1 mg de DSPC, 19,1 mg de

DSPE-PEG-2K, 2,76 mg de Piro-fosfolípido y 21,1 mg de colesterol en 1 mL de etanol a 60-70°C, a continuación se inyectaron 4 mL de tampón de sulfato de amonio 250 mM (pH 5,5) en los lípidos mezclados (ambos lípidos mezclados y tampón de sulfato de amonio se almacenaron a 60-70 °C durante la inyección). Lípidos y tampón se mezclaron completamente. La solución se pasó 10 veces a 60-70°C a través de membranas apiladas secuencialmente de policarbonato de tamaño de poro de 0,2, 0,1 y 0,08 µm utilizando un extrusor de nitrógeno de alta presión (Northern Lipids). Se extrajo sulfato de amonio libre mediante diálisis en una solución de 800 mL de sacarosa al 10 % con 10 mM de histidina (pH 6,5) con al menos 2 cambios de tampón.

Carga y liberación de liposomas de PoP. Se cargó doxorubicina (Dox; LC Labs # D-4000) añadiendo la proporción indicada de fármaco e incubando a 60°C durante 1 hora. Se determinaron los tamaños de liposoma utilizando dispersión de luz dinámica en PBS. La eficiencia de carga se determinó pasando 25 mL de liposomas diluidas en 1 mL de PBS sobre una columna de Sephadex G-75. Se recogieron 24 fracciones de 1 mL y se determinó la eficiencia de carga como el porcentaje de los fármacos en las fracciones que contenían liposomas (que eluyen en los primeros 3-10 mL). Dox se midió utilizando fluorescencia con una excitación de 480 nm y una emisión de 590 nm utilizando un lector de microplacas de fluorescencia TECAN Safire. Los experimentos de liberación desencadenada por luz se llevaron a cabo utilizando un diodo láser de 665 nm de potencia ajustable (láser RPMC, LDX-3115-665) con una tasa de fluencia de ~310 mW/cm<sup>2</sup> y se midió liberación de Dox en tiempo real en un fluorímetro (PTI). Las irradiaciones se llevaron a cabo en suero bovino maduro estéril al 50% (Pel-Freez #37218-5) a 37°C. La temperatura se midió insertando una sonda de termopar de tipo K directamente en la solución irradiada. La liberación de Dox se evaluó midiendo la liberación antes y después de tratamiento. La liberación se calculó utilizando la fórmula de Liberación=(F<sub>final</sub>-F<sub>inicial</sub>)/(F<sub>X-100</sub>-F<sub>inicial</sub>)\*100%.

Microscopia de crió-electrónica. Para crió-EM se prepararon rejillas de carbono hueco (c-plano CF-2/2-2C-T) con una capa adicional de carbono fino continuado (5-10 nm) y se trataron con descargas luminiscentes de 5 mA durante 15 s. A continuación, se aplicaron 3,4 µL de liposomas cargados con doxorubicina en tampón que contenía solución de sacarosa al 10% y 10 mM de histidina (pH 6,5) a las rejillas durante 30 segundos. Para llevar a cabo la vitrificación de las muestras, las rejillas se transfirieron y se sumergieron en etano líquido a ~-180°C utilizando un Vitrobot (FEI) con la cámara de transferencia mantenida a 25°C y 100% de humedad relativa. Los liposomas se escanearon en un microscopio electrónico de transmisión JEOL2010F a 200kV utilizando un crió-soporte Gatan 914. Las imágenes se recogieron con aumento de 50.000 y utilizando una dosis total de ~20 electrones por Å<sup>2</sup> y un intervalo de desenfoque entre -7 y -11 micrones. Las imágenes se registraron en películas SO-163. Las micrografías se digitalizaron en un escáner Nikon Super Coolscan 9000.

Estabilidad de almacenamiento de liposomas. Los liposomas de PoP ocultos cargados con Dox (proporción molar de fármaco a lípido de 1:5) se almacenaron a 4°C en viales de ámbar cerrados sin cualquier otra precaución y se extrajeron periódicamente los liposomas para análisis rutinarios. La estabilidad de carga, tamaño, polidispersidad, estabilidad en suero y tasas de liberación desencadenada por luz se analizaron cada dos semanas a lo largo de 3 meses con 3 lotes de liposomas preparados por separado. Se determinaron tamaños de liposomas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) utilizando dispersión de luz dinámica. Para las mediciones de estabilidad en suero, los liposomas se diluyeron 200 veces (hasta 13,5 mg/mL de Dox) en PBS que contenía suero bovino maduro al 50% (Pel-Freez #37218-5). Se tomaron las primeras lecturas y se incubaron las muestras recogidas a 37°C durante 6 horas. Se añadió X-100 al 0,5% para lisar los liposomas y se leyeron los valores finales de fluorescencia. La liberación de Dox se calculó de acuerdo con la fórmula de % de Liberación=(F<sub>final</sub>-F<sub>inicial</sub>)/(F<sub>X-100</sub>-F<sub>inicial</sub>)\*100%. Se determinaron la estabilidad de carga y liberación desencadenada por luz como se describe anteriormente.

Farmacocinética. Todos los procedimientos en este trabajo realizados en ratones se aprobaron por la Universidad en el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Búfalo. Se inyectaron por vía intravenosa en vena de la cola ratones hembras (hembra CD-1, 18-20 g, Charles River) con liposomas con Dox-PoP, Dox liposomal estabilizado estéricamente o liposomas con HPPH al 10% (10 % molar de HPPH-lípido, 35 % molar de colesterol, 5 % molar de DSPE-PEG-2K y 50 % molar de DSPC) con una dosis de 10 mg/kg de Dox (N=4 por grupo). Se tomaron muestras de pequeñas cantidades de sangre en puntos submandibular y retroorbital en los periodos de tiempo indicados. La sangre se centrifugó a 2000 x g durante 15 minutos. Se añadieron 10 mL de suero a 990 µL de tampón de extracción (HCl 0,075N HCl, isopropanol al 90%) y se almacenaron durante 20 minutos a -20°C. Las muestras se mezclaron y se calentaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 xg. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron mediante fluorescencia. Las concentraciones de Dox se determinaron a partir de curvas estándar. Los parámetros farmacocinéticos no compartimentados se analizaron mediante PKsolver.

Absorción del fármaco por tumor. Se inocularon ratones desnudos hembras de cinco semanas (Jackson Labs, #007850) con 5 x 10<sup>6</sup> células MIA Paca-2 en ambos costados y se agruparon de manera aleatoria cuando los tamaños de los tumores alcanzaron 6-8 mm (n=4). 1 hora después de la inyección intravenosa con 5 mg/kg o 10 mg/kg de liposomas ocultos con Dox-PoP, los ratones se trataron con 350 mW/cm<sup>2</sup> de un diodo láser de 665 nm (láser RPMC, LDX-3115-665) durante 15 minutos o 30 minutos en un costado. Los ratones se sacrificaron inmediatamente después del tratamiento y se recogieron los tumores. Para determinar la deposición de fármaco en el tumor, los tumores se homogeneizaron en tampón de lisado nuclear [0,25 mol/L de sacarosa, 5 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/l de MgSO<sub>4</sub>, 1 mmol/L de CaCl<sub>2</sub> (pH 7,6)] y se extrajeron durante la noche en HCl 0,075 N e isopropanol al 90 %. Se determinaron

Dox y Piro-fosfolípido utilizando mediciones de fluorescencia.

Temperatura y flujo sanguíneo del tumor. Los ratones que tenían tumores MIA Paca-2 se agruparon en 4 grupos: Dox-PoP+láser (350 mW/cm<sup>2</sup>), Dox-PoP+láser (250 mW/cm<sup>2</sup>), láser únicamente (350 mW/cm<sup>2</sup>) y control sin láser (n=3-4). Los ratones en los primeros dos grupos se inyectaron por vía intravenosa con 7 mg/kg de Dox-PoP. 1 hora después de inyección, los ratones se anestesiaron y se colocaron sobre una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal aproximadamente 35°C. El flujo sanguíneo del tumor se midió utilizando láser Doppler (moorLDI2-IR) en modo de un único punto. Se inició iluminación por láser de 665 nm para fototratamiento 5 minutos después de estabilizar el flujo sanguíneo. Después de 30 minutos de iluminación, los ratones se monitorizaron durante otros 10 minutos. Se analizaron los datos como % de velocidad de flujo comparada con la de los primeros cinco minutos. Las temperaturas tumorales durante el transcurso del tratamiento se registraron utilizando cámara infrarroja (serie FLIR ix).

Estudio de supervivencia. 5x10<sup>6</sup> células MIA Paca-2 (obtenidas de ATTC) se inyectaron en el costado derecho de ratones desnudos hembras (5 semanas, Jackson Labs, #007850). Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 4-6 mm de diámetro, los ratones que tenían tumores de MIA Paca-2 se agruparon de la siguiente manera: 1) Control con solución salina; 2) láser Dox-PoP; 3) PoP vacíos + láser; 4) Dox-PoP+láser. N=5-6. La dosis para Dox-PoP es de 7 mg/kg para Dox y la dosis de PoP se ajustó para ser equivalente a la de Dox-PoP de 7mg/kg (promedio de carga de Dox a lípido de 1:5), que es de 1,225 mg/kg (1,21mmol/kg de Piro-fosfolípido). Para experimentos de diferentes dosis, se estudiaron otros dos grupos de Dox-PoP+láser (3mg/kg basados en Dox) y Dox-PoP+láser (5mg/kg basados en Dox). Se usaron 21mg/kg de Dox liposomal estabilizado estéricamente (HSPC:CHOL:DSPE-PEG-2K =56,3:38,4:5,3 % molar) para el tratamiento estándar de Doxil®. Se usó Dox libre de 7 mg/kg como un control de fármaco libre. 1 hora después de inyección intravenosa, los tumores que necesitan tratamiento con láser se irradiaron todos con una tasa de fluencia de 300 W/cm<sup>2</sup> durante 16 minutos 40 segundos (fluencia total de 300 J/cm<sup>2</sup>). HPPH se diluyó en PBS que contenía 2% de etanol y 0,2% de Tween 80 y se inyectó con una dosis de 1,21 mmol/kg. Se llevó a cabo tratamiento con luz 24 horas después de inyección. El tamaño del tumor se monitorizó 2-3 veces por semana y se evaluaron volúmenes tumorales midiendo las dimensiones de 3 tumores utilizando un calibrador y la fórmula de elipsoide: Volumen=  $\pi \cdot L \cdot W \cdot H/6$ , donde L, W y H son la longitud, el ancho y la altura del tumor, respectivamente. Los pesos de los ratones se monitorizaron cada semana. Los ratones con MIA PaCa-2 se sacrificaron cuando el volumen excedió 10 veces su volumen inicial.

Análisis estadístico. Todos los datos se analizaron utilizando software Graphpad prism (Versión 5.01) como se indica en las leyendas de figura. Para la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, cada pareja de grupo se comparó utilizando la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). El procedimiento Bonferroni se utiliza para ajustar comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significantes con  $p < 0,05$ . El promedio de supervivencia se define como el tiempo cuando la curva de supervivencia escalonada cruza el 50% de supervivencia.

Resultados. Se describió que el PoP de HPPH-lípido, pero no Piro-fosfolípido, podía atrapar la carga cuando los liposomas se formaban con 95 % molar de PoP y se prepararon posteriormente liposomas cargados con Dox con 10 % molar de PoP HPPH-lípido. El Piro-fosfolípido se examinó una vez más debido a su extrema facilidad de síntesis y escasez de estereocentros. Los liposomas se prepararon con distearoilfosfolina (DSPC), Colesterol (CHOL), DSPE-PEG-2K y Piro-fosfolípido. Se incluyó 5 % molar de DSPE-PEG-2K y los lípidos restantes se cambiaron como se indica en la **Figura 1A**. Las cantidades crecientes de Piro-fosfolípido evitaron que los liposomas se cargaran de manera activa de Dox utilizando un gradiente de sulfato de amonio interno a 60 °C, un procedimiento establecido para la carga liposomal de fármaco. Sin embargo, este efecto se podía contrarrestar aumentando la concentración de colesterol. Los liposomas con concentraciones más altas de piro-fosfolípido se podrían cargar utilizando concentraciones más altas de colesterol. Los liposomas con 30 % molar de colesterol podían cargar de manera efectiva Dox, pero no cuando las cantidades de Piro-fosfolípido son tan bajas como 1 % molar estaban incluidas en la formulación. Con 35 % molar de colesterol, se podía cargar Dox solamente en liposomas que contienen cantidades pequeñas de Piro-fosfolípido (0-2 % molar). La cantidad máxima de piro-fosfolípido que podía incorporarse en liposomas cargados con Dox se aumentó hasta 5 y 8 % molar cuando 40 y 45 % molar de colesterol se incluyeron en la formulación, respectivamente. Este fenómeno con un comportamiento de carga relativamente repentino fue tanto sorprendente como no esperado y no se observó en liposomas convencionales que carecen de Piro-fosfolípido. Tal como se muestra en la **Figura 1B**, la carga de Dox con una proporción de fármaco a lípido relativamente alta (1:5) también se impactó con el contenido de colesterol. A diferencia de liposomas convencionales, que se cargaron con Dox en todas las condiciones, los liposomas de PoP formados con 2 % molar de piro-fosfolípido se podían cargar solamente si se incluía más del 35 % de colesterol. Los liposomas de PoP de piro-fosfolípido con 45 % molar de colesterol permitían una carga robusta activa de Dox.

Para caracterizar la morfología de los liposomas Dox-PoP se utilizó microscopía de crioelectrónica. Los liposomas se formaron con [DSPC:CHOL:PEG-lípido:Piro-fosfolípido] con una proporción molar de [53:40:5:2] con promedio de carga de Dox a lípido de 1:5. Las micrografías electrónicas revelaron una estructura asimétrica no esperada (**Figura 1C**). Cada liposoma cargado con Dox incluía un objeto denso de electrones prominente (indicado con flechas) que estaba ausente de los mismos liposomas sin carga de Dox (**Figura 10**). Presuntamente estos fueron precipitados de sulfato de Dox y se localizaron típicamente fuera de centro. La parte de la bicapa cerca del precipitado de Dox tenía

una curvatura reducida.

La **Figura 1D** demostró que la carga de liposomas Piro estaba afectada con la relación de fármaco a lípido. Se puede cargar la cantidad máxima de doxorubicina en liposomas Piro con 2 % molar de piro-fosfolípido 40 % molar de Colesterol es de 1:5 (relación molar de Dox a lípido), por encima de esto se puede cargar menos de 10% de doxorubicina. Sin embargo, este no es el caso de liposomas libres de Piro-fosfolípido cuando la eficiencia de carga se disminuye gradualmente con una relación molar más alta de Dox a lípido.

La liberación desencadenada por luz se evaluó *in vitro* con liposomas Dox-PoP a 37°C en suero bovino al 50%. Tal como se muestra en la **Figura 2A**, las cantidades crecientes de PoP llevaron a velocidades de liberación inducidas por luz NIR más rápidas, consiguiendo la liberación completa en pocos minutos para la mayoría de formulaciones. Los tiempos más rápidos para lograr el 50% de liberación tuvo lugar en liposomas que contenían entre 2-8 % molar de PoP (**Figura 2B,C**). Sin embargo, cuando la velocidad de liberación se normalizó a la cantidad de piro-fosfolípido en la membrana, se encontró que 2% de piro-fosfolípido era óptimo para cada piro (**Figura 2D**). En otras palabras, si la dosis establecida de fotosensibilizador tenía que inyectarse, tenerla en la forma de 2 % molar de liposomas de PoP daría como resultado la cantidad más grande de liberación de Dox desencadenada por luz. Por lo tanto, se seleccionaron 2% de PoP para futuros experimentos ya que además de proporcionar la liberación más rápida por unidad de PoP, la concentración disminuida de PoP reduce los efectos secundarios potenciales clínicos relacionados con fotosensibilizador, tal como toxicidad cutánea a luz solar.

Aunque el aumento de colesterol permitió la carga de Dox en liposomas de PoP (**Figura 1**), también se ralentizó la velocidad de liberación de Dox desencadenada por luz. Tal como se muestra en la **Figura 3A**, los liposomas de PoP que contienen 35% de colesterol liberaron Dox de forma más rápida cuando se expusieron a luz láser NIR, mientras que aquellos con 50% de colesterol liberaron más lentamente. No era factible usar menos colesterol para aumentar las velocidades de liberación, ya que se requería cargar la Dox en los liposomas. El tiempo de irradiación requerido para inducir la liberación del 50% de Dox de los liposomas de PoP mostró una clara tendencia a una liberación más lenta que tiene lugar con el aumento del colesterol (**Figura 3B**), observándose una ralentización sustancial con un 50% molar de colesterol. El 40% molar de colesterol proporcionó el mejor equilibrio entre la eficiencia de carga de Dox y la liberación rápida de Dox desencadenada por la luz.

Se investigó el efecto de DSPE-PEG-2K en la carga de Dox y la liberación desencadenada. Se formaron liposomas de PoP que incorporan 45% molar de colesterol (seleccionado para estimular una carga activa eficaz) y 2% molar de piro-fosfolípido con cantidades variables de DSPE-PEG-2K. Tal como se muestra en la **Figura 3C**, el tiempo requerido para la liberación del 50% de Dox aumentó de 1,2 min a 2,8 min cuando se usó 8% molar de DSPE-PEG-2K en lugar de 3%. Sin embargo, DSPE-PEG-2K también jugó un papel en la carga de Dox, con una eficiencia de carga óptima observada con 5% molar (**Figura 3D**), una cantidad que mantuvo una liberación desencadenada razonablemente rápida (**Figura 3C**). Por tanto, después de considerar cada componente lipídico, los liposomas de PoP que contienen DSPC: CHOL: PEG-lípido: PoP con una relación molar de 53: 40: 5: 2 se finalizaron como supuestos liposomas ocultos de PoP para una evaluación adicional.

Se desarrolló previamente una formulación con 10% molar HPPH-lípido en base a la liberación óptima de calceína. Sin embargo, se encontró que la cantidad óptima de lípido HPPH para la liberación de doxorubicina cargada activamente fue del 2% molar (**Figura 11**). Si bien HPPH-lípido confirió a los liposomas ocultos convencionales propiedades de liberación inducida por la luz, también condujo al escape de los liposomas. A diferencia de Piro-fosfolípido, los liposomas de PoP formados a partir de HPPH-lípido no pudieron lograr un equilibrio aceptable entre la estabilidad del suero y la liberación rápida desencadenada por láser NIR (**Figura 12**). La formulación desarrollada con 2% molar de Pirofosfolípidos liberó contenidos sustancialmente más rápido que la formulación descrita anteriormente (**Figura 13**).

A continuación, se investigó el efecto de la relación de carga de fármaco a lípido sobre la eficacia de encapsulación, las velocidades de liberación desencadenada y la estabilidad en suero a 37 °C de los liposomas ocultos PoP. La **Figura 4A** muestra que la eficacia de encapsulación de Dox en liposomas de PoP (con 2% molar de Piro-fosfolípido) con proporciones crecientes de carga de fármaco a lípido exhibió un punto de transición agudo, más allá del cual la carga de fármaco fue ineficaz. Esto contrastaba con los mismos liposomas que carecían de pirofosfolípidos, que exhibían eficacias de encapsulación de fármacos que disminuían gradualmente a medida que aumentaban las proporciones de carga de fármaco a lípido. La proporción más alta de carga de fármaco a lípido que se pudo cargar de manera efectiva fue 1:5 (mostrado como 0.2:1 en el gráfico) y más allá de esa proporción se pudo cargar menos del 10% del Dox. Para los liposomas de PoP Piro-fosfolípido, no hubo relación entre la proporción de carga de fármaco y la velocidad de liberación de fármaco desencadenada por la luz y las velocidades de liberación fueron muy consistentes entre todas las muestras (**Figura 4B**). La **Figura 4C** muestra que los liposomas de PoP con proporciones de carga variables exhibieron todos una excelente estabilidad en suero *in vitro*. Se seleccionó una proporción de fármaco a lípido de 1:5 para su uso posterior, ya que minimiza la cantidad de piro-fosfolípido inyectado para evitar posibles efectos secundarios inducidos por fotosensibilizador.

Se evaluó la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de los liposomas ocultos de PoP (**Fig. 1C**). Los liposomas se almacenaron a 4 °C en viales ámbar cerrados sin ninguna otra precaución y los liposomas se retiraron periódicamente para análisis de rutina. La estabilidad de carga, el tamaño, la polidispersidad, la estabilidad del suero y

las velocidades de liberación desencadenadas por la luz se evaluaron cada dos semanas durante 3 meses con 3 lotes de liposomas preparados por separado. Tal como se muestra en la **Figura 5A**, más del 95% de Dox permaneció atrapado de forma estable dentro de los liposomas ocultos de PoP. Las **Figuras 5B y 5C** muestran que para todos los lotes preparados por separado, el tamaño de los liposomas ocultos de PoP permaneció cerca de 100 nm, junto con un índice de polidispersidad bajo cercano a 0,05, lo que indica una población pequeña y monodispersa de nanopartículas. De manera consistente durante el período de almacenamiento, menos del 10% de Dox cargada se escapó de los liposomas cuando se incubó durante 6 horas en suero bovino al 50% a 37 °C in vitro (**Figura 5D**). Por tanto, para un fototratamiento que se produce poco después de la administración intravenosa de los liposomas, se podría predecir que se produciría una pequeña fuga inducida por suero. La velocidad de liberación de Dox desencadenada por luz NIR de los liposomas ocultos de PoP se mantuvo relativamente estable durante el almacenamiento, y se requirieron cerca de dos minutos de irradiación para lograr una liberación del 50% de Dox (**Figura 5E**). Por lo tanto, a pesar de la alta relación de carga de fármaco a lípido de 1:5, que dio lugar a una morfología de liposomas asimétrica e inusual (**Figura 1C**), los liposomas ocultos de PoP cargados con Dox exhibieron una excelente estabilidad de almacenamiento según todas las métricas examinadas. Actuaron de manera consistente en ensayos funcionales por ser estables en suero en ausencia de luz NIR, aunque liberaron rápidamente el contenido cuando se expusieron a la misma.

Se estudió el comportamiento farmacocinético de liposomas ocultos de PoP cargados con Dox después de la administración intravenosa a ratones CD-1. Tal como se muestra en la **Figura 6**, Dox encapsulado demostró un perfil farmacocinético de larga circulación. El tiempo de eliminación en sangre y la vida media de Dox en los liposomas ocultos de PoP fueron cercanos a los de los liposomas ocultos convencionales (que no contienen piro-fosfolípidos; equivalente a Dox liposomal estabilizado estéricamente o SSL Dox). Los liposomas ocultos de PoP cargados con Dox exhiben una vida media circulante de 21,9 horas con un área bajo la curva (AUC) de 4837  $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ . La vida media de los liposomas SSL Dox fue de 16,9 horas con un área bajo la curva de 5.695  $\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{h})$ . Estas formulaciones exhibieron vidas medias en circulación y AUC sustancialmente mayores que los liposomas de PoP previamente descritos que incluían un 10% molar de lípidos HPPH y un 35% molar de colesterol. La **Tabla 1** enumera los parámetros farmacocinéticos de los liposomas ocultos de PoP cargados con Dox y otras formulaciones de liposomas cargados con Dox.

**Tabla 1: Análisis farmacocinético no compartimental de DoxT liposomal**

	$T_{1/2}$ (h)	$C_{\max}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$ )	$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (h)	Cl ( $\text{ml}/\text{h}/\text{g}$ )	$V_{ss}$ ( $\text{ml}/\text{g}$ )
Liposomas piro al 2%	21,9	250,1	4837	29,3	0,002	0,06
Liposomas piro al 0%	16,9	275,0	5695	22,8	0,002	0,04
Liposomas HPPH al 10%	1,6	224,2	581	2,1	0,02	0,04

MRT; tiempo medio de residencia. AUC; el área bajo el producto de  $c \cdot t$  graficada contra  $t$  desde el tiempo 0 hasta el infinito. Cl, aclaramiento.  $V_{ss}$ , volumen de distribución en estado estacionario.

Se inocularon ratones desnudos contralateralmente con las células cancerosas pancreáticas humanas MIA Paca-2 en ambos flancos para generar un modelo de tumor dual para estudios de captación de Dox desencadenada por luz. Este procedimiento implica un tumor que se trata con luz NIR y el otro sirve como control. El tiempo de tratamiento y la dosis inyectada se investigaron midiendo la captación de Dox del tumor inmediatamente después del tratamiento con láser NIR. 1 hora después de la inyección intravenosa con 5 mg/kg o 10 mg/kg de Dox (dosis total de Dox inyectada por vía intravenosa, encapsulada en liposomas de PoP ocultos), los tumores se irradiaron con láser durante 15 o 30 minutos. La captación tumoral de Dox en el grupo irradiado con láser fue 6-7 veces mayor que la de los tumores que no recibieron tratamiento con láser (**Figura 7A**). La deposición del fármaco en los tumores dependió de la dosis inyectada, y la dosis inyectada de 10 mg/kg dio como resultado 13,8  $\mu\text{g}$  de Dox por gramo de tumor (para el tumor tratado con láser), que fue aproximadamente el doble de la concentración en el tumor de la dosis inyectada de 5 mg/kg (con una concentración de Dox en tumor tratado con láser de 7,0  $\mu\text{g}$  de Dox por gramo de tumor).

Aunque la dosis inyectada impactó directamente en la captación de Dox desencadenada por luz en el tumor, diferentes dosis de luz (aplicada usando diferentes tiempos de irradiación de 15 y 30 minutos) no tuvieron un efecto marcado. Los ratones tratados con una dosis inyectada de 10 mg/kg e irradiados durante 15 o 30 minutos dieron como resultado 9,6 y 13,2  $\mu\text{g}$  de Dox por gramo en tejido tumoral tratado con láser, respectivamente, y estos no fueron estadísticamente significativamente diferentes (**Figura 7B**). Se requiere más investigación para comprender mejor el impacto de las diferentes dosis de luz, pero el tratamiento con láser posiblemente podría inducir una estasis vascular parcial, evitando que fluyan más liposomas hacia los tumores.

Se examinó el efecto del tratamiento con láser en la temperatura del tumor (**Figura 8A**). Una hora después de la dosificación de 7 mg/kg de Dox, se aplicó radiación láser a 350  $\text{mW}/\text{cm}^2$  y provocó que la temperatura de la superficie del tumor aumentara hasta 45°C durante 30 minutos de radiación. Cuando la tasa de fluencia se redujo a 250  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , la temperatura aumentó a menos de 40 °C. Este aumento de temperatura fue similar al calentamiento de la superficie

del tumor observado cuando se aplicaron 350 mW/cm<sup>2</sup>, sin la inyección previa de liposomas de PoP. El flujo sanguíneo del tumor se evaluó con análisis de láser Doppler, una técnica que puede sondear de forma no invasiva la perfusión superficial en el tejido investigado. Tal como se muestra en la **Figura 8B**, en ausencia de liposomas PoP, el flujo sanguíneo del tumor no fue inhibido por el tratamiento con láser de 350 mW/cm<sup>2</sup>, y aumentó con el tiempo en aproximadamente un 50%, posiblemente debido a los efectos de calentamiento térmico. Los tumores irradiados cuando los liposomas ocultos de PoP circulaban en la sangre exhibieron una dinámica de flujo sanguíneo drásticamente diferente (**Figura 8C**). El flujo sanguíneo tumoral inicialmente disminuyó drásticamente, seguido de un aumento y a continuación una disminución posterior. Esta tendencia se observó a tasas de fluencia de 250 mW/cm<sup>2</sup> y 350 mW/cm<sup>2</sup>. El bloqueo vascular continuó después de que se apagó el láser después de 30 minutos de irradiación. La disminución del flujo sanguíneo durante la irradiación con láser no se debió al calentamiento del tumor, ya que el tratamiento con 250 mW/cm<sup>2</sup> dio lugar a un calentamiento similar al tratamiento con 350 mW/cm<sup>2</sup> sin fármaco, que no mostró ningún bloqueo vascular (**Figura 8B**). En ratones con terapia fotodinámica de alta fluencia (PDT) se ha descrito el fenómeno de una disminución inmediata del flujo tumoral, seguido de un aumento posterior. Cuando se representaron gráficamente en función de la fluencia acumulada, los tratamientos con 250 mW/cm<sup>2</sup> y 350 mW/cm<sup>2</sup> exhibieron patrones similares de dinámica vascular tumoral (**Figura 8D**).

La eficacia antitumoral de los liposomas de PoP ocultos con Dox se evaluó en ratones desnudos que portaban tumores subcutáneos MIA Paca-2 únicos. Tal como se muestra en la **Figura 9A**, a una dosis de 7 mg/kg de Dox (o equivalente), tanto los liposomas ocultos PoP cargados con Dox solos (sin tratamiento con láser) como el liposoma oculto de PoP descargado con tratamiento con láser proporcionaron algún beneficio terapéutico al prolongar los tiempos medios de supervivencia en comparación a ratones de control no tratados de 21 días a 30,5 días para ambos grupos. Sin embargo, se observó una fuerte sinergia terapéutica para los liposomas ocultos de PoP cargados con Dox con tratamiento con láser, ya que este enfoque condujo a la supervivencia total de todos los ratones y fue significativamente más efectivo que los dos tratamientos de control mencionados anteriormente ( $P < 0,05$ ). Con una dosis de 7 mg/kg de Dox en liposomas ocultos de PoP, todos los tumores fototratados retrocedieron eficazmente a menos de 20 mm<sup>3</sup> dentro de las dos semanas de tratamiento y todos los ratones sobrevivieron a la duración del estudio (60 días) con 3 de 6 tumores curados permanentemente. Se examinó la eficacia fototerapéutica de los liposomas de PoP ocultos cargados con Dox a dosis más bajas (**Figura 9B**). Tanto 3 mg/kg como 5 mg/kg de Dox fueron muy eficaces para retrasar el crecimiento tumoral. Los ratones tratados con láser tratados con liposomas Dox-PoP tuvieron un tiempo medio de supervivencia de 43,5 días con 3 mg/kg de Dox y 57 días con 5 mg/kg de Dox. Para los ratones tratados con 5 mg/kg de Dox, se observó un recrecimiento del tumor en solo 3 de 6 ratones. En todos los casos, los fototratamientos de liposomas ocultos de PoP cargados con Dox fueron bien tolerados, tal como demuestra la masa corporal sana en todos los ratones tratados (**Figura 9C**).

Tal como se muestra en la **Figura 9D**, el fototratamiento con liposomas ocultos de PoP cargados con Dox fue sustancialmente más efectivo que los tratamientos de dosis única de quimioterapia convencional o PDT. La Dox libre, en su dosis máxima tolerada de 7 mg/kg, fue un tratamiento ineficaz contra los tumores MIA Paca-2, sin un retraso significativo en el crecimiento del tumor en comparación con los ratones de control (mediana de supervivencia 19 frente a 21 días). El Dox estabilizado estéricamente (SSL Dox) podía administrarse a una dosis máxima tolerada tres veces mayor en comparación con el fármaco libre, y mejoró la supervivencia en comparación con el control (mediana de supervivencia de 40 días frente a 21 días,  $P < 0,05$ ). La PDT convencional mostró una inhibición del crecimiento tumoral similar (mediana de supervivencia de 38 días) cuando se administró con una dosis de luz equivalente y una dosis inyectada equivalente de HPPH, un fotosensibilizador con propiedades espectrales similares al Piro-fosfolípido y actualmente en ensayos clínicos. Los liposomas ocultos de PoP cargados con Dox con tratamiento con láser fueron significativamente más efectivos que estas tres modalidades anticancerígenas que se han utilizado en la clínica. El tratamiento estándar de SSL Dox a una dosis alta (21 mg/kg) desarrolló posteriormente erupciones en las patas de los ratones, que es un síntoma típico de eritrodisestesia palmo-plantar (PPE) a dosis altas de doxorubicina liposomal oculta. Los volúmenes tumorales revelaron que todos los fototratamientos con Dox con liposomas ocultos de PoP fueron más eficaces que las dosis máximas toleradas de Dox libre y SSL (**Figura 9E**). El fototratamiento con liposomas ocultos de PoP con 3 mg/kg de Dox fue ligeramente más eficaz que SSL Dox a 21 mg/kg. Incluso con una supuesta depuración sanguínea más rápida observada con dosis más bajas de liposoma inyectado, los liposomas de PoP se pueden utilizar al menos en una dosis 7 veces menor con una eficacia terapéutica superior a la SSL Dox convencional. Estos resultados son alentadores para lograr la ablación del tumor con efectos secundarios mínimos.

Discusión. En este estudio, examinamos sistemáticamente todos los componentes lipídicos de los liposomas de PoP para desarrollar con éxito una formulación que 1) pudiera cargarse activamente con Dox con alta eficacia y proporciones de carga; 2) fuera estable in vitro durante el almacenamiento y en suero; 3) tuviera tiempos de circulación prolongados in vivo; y 4) pudiera liberar rápidamente Dox cuando se expone a luz NIR. Cantidades crecientes de colesterol permitieron una carga activa con cantidades crecientes de PoP, que a su vez tendían a desestabilizar la bicapa y evitar la carga de Dox. Aunque se sabe que el colesterol mejora la estabilidad de los liposomas, se requieren más estudios para determinar mejor el papel que juega el colesterol en la función y estructura de los liposomas de PoP. Cantidades crecientes de colesterol también ralentizaron la liberación de Dox desencadenada por la luz, al igual que DSPE-PEG-2K. Sin embargo, ambos componentes eran necesarios para una carga de Dox eficaz. Fueron posibles altas relaciones de carga de Dox a lípido (1:5) y dieron lugar a una morfología liposomal inusual, tal como se demuestra en la **figura 1C**. Es de interés cómo el colesterol y el DSPE-PEG-2K ralentizan la liberación del fármaco desencadenada por la luz y se requiere una mayor aclaración de los aspectos mecánicos.

Cantidades crecientes de Piro-fosfolípido inhibieron la carga de Dox en liposomas de PoP, un efecto que tuvo que ser contrarrestado incrementando el contenido de colesterol. El aumento de piro-fosfolípido también aumentó la velocidad de liberación desencadenada por la luz. Se seleccionó una cantidad óptima de Piro al 2% molar ya que esto proporcionó la velocidad de liberación más rápida cuando se normalizó por la cantidad de Piro-fosfolípido en la bicapa. Aunque se ha demostrado que el piro-fosfolípido es bien tolerado en ratones a dosis intravenosas de hasta 1 g/kg, se prefiere la administración de dosis más bajas de moléculas fotosensibilizantes a los pacientes para evitar la toxicidad indeseada de la luz solar o la formación de edemas en el área irradiada, tal como se observa en el tratamiento con PDT. Utilizando la formulación desarrollada de liposomas ocultos de PoP cargados con Dox, la dosificación de Dox en una dosis humana baja de 5 mg/m<sup>2</sup>, correspondería a una dosis de PoP en el rango estimado de 1 mg/m<sup>2</sup> o 0,03 mg/kg, una dosis de fotosensibilizador que es órdenes de magnitud menor que Photofrin clínicamente aprobado, que generalmente se administra en dosis de 2 mg/kg.

Se observó inmediatamente después de tratamiento con láser, un aumento de 6-7 veces de la captación tumoral de la doxorubicina. El sorprendente aumento de la concentración de fármaco tumoral es probablemente un factor importante para la eficacia de este tratamiento. La acumulación mejorada de fármaco puede deberse a una combinación de liberación de fármaco, permeabilización de vasos mediada por hipertermia y también un efecto de permeabilidad vascular inducida por PDT. Tanto la liberación desencadenada como PDT se pueden usar como medios para mejorar la administración de fármacos. Se necesitan más estudios para determinar a fondo las contribuciones de cada mecanismo en la captación mejorada del fármaco y la biodisponibilidad mejorada. Cuando el tiempo de tratamiento con una radiación de 350 mW/cm<sup>2</sup> aumentó de 15 a 30 minutos, aumentó la captación del fármaco tumoral, pero no con significación estadística. Tal como se muestra en la **Figura 8C**, después de 20 minutos de irradiación, el flujo sanguíneo disminuyó en el tumor, lo que limitó la cantidad de fármaco que podía depositarse. Probablemente estaba ocurriendo una estasis microvascular inducida por PDT e inhibiendo el suministro adicional de liposomas a los volúmenes irradiados. Para los estudios de inhibición del crecimiento tumoral, se realizó un tratamiento de 16,7 minutos con una tasa de fluencia intermedia de 300 mW/cm<sup>2</sup>, de modo que el calentamiento del tumor no excediera los 43 °C y el bloqueo vascular durante el tratamiento fuera mínimo. Las direcciones futuras incluyen la combinación de este tratamiento con anticoagulantes, lo que podría reducir la estasis vascular inducida por la PDT y mejorar aún más la captación de fármacos por el tumor.

Conclusión. Se desarrolló una formulación robusta de liposomas de PoP ocultos, de circulación prolongada, estabilizado estéricamente, que puede activarse mediante luz NIR para liberar fármacos encapsulados. Los liposomas de PoP ocultos cargados con Dox exhibieron estabilidad de almacenamiento a largo plazo. La eficacia antitumoral de la quimofototerapia con liposomas de PoP fue superior a PDT convencional (usando HPPH) y hasta una dosis única máxima tolerada de Dox, administrada libremente o en liposomas de circulación prolongada.

## EJEMPLO 2

Este ejemplo describe además la preparación de liposomas PpP, y la carga y la liberación de la carga.

Se prepararon muestras con 45% de colesterol y 2% de piro-fosfolípido con cantidades variables de PEG (**Figura 14**). Se encontró que el contenido de PEG-lípido de los liposomas tenía un efecto sobre la carga y liberación de doxorubicina, con una carga óptima a un contenido de PEG-lípido del 5% y una liberación más rápida con un 3% de PEG-lípido. Se demostró que el 5% de PEG-lípido era el óptimo, ya que proporcionaba la mayor carga de fármaco con una buena velocidad de liberación.

Con el fin de demostrar que la liberación inducida por piro-fosfolípidos es aplicable a una amplia gama de formulaciones, probamos la carga y liberación de doxorubicina con alternativas a DSPC, que incluyen varios lípidos de PC (**Figura 15**) y otro tipo de lípidos que incluyen lípidos de fosfatidiletanolamina (PE) y ácido fosfatídico. (PA) (**Figura 16**). La **Figura 17** demostró que otro fármaco, el irinotecán, podía cargarse y liberarse con varias alternativas de DSPC, incluidos los lípidos catiónicos DOTAP, PA, PE y lípidos de fosfatidilglicerol (PG). El colesterol también podría ser reemplazado por análogos de colesterol que incluyen beta-colestanol, sitosterol y estigmasterol (**Figura 18**). Además, probamos la carga y liberación de otros fármacos (irinotecán y daunorrubicina). En el caso del irinotecán, la formulación utilizada estaba libre de PEG y consistió en esfingomielina, pirofosfolípido y colesterol. Una formulación de DSPC/PEG-lípido/piro-fosfolípido/colesterol usada para daunorrubicina con 50% de colesterol usado (**Figura 19**), ya que la daunorrubicina no se puede cargar cuando se usan concentraciones de colesterol más bajas. También se probaron piro-fosfolípidos con una estructura modificada, donde se utilizaron los lípidos que contenían cadenas laterales de 14, 16 (normales) o 18 acilos para la conjugación (**Figura 20**). Los resultados mostraron que el irinotecán podía cargarse y liberarse de liposomas con cadenas laterales de 14, 16 y 18 carbonos y que la doxorubicina podía cargarse y liberarse de liposomas con cadenas laterales de 16, 18 carbonos.

Por lo tanto, los liposomas de PoP, tal como se describen en el presente documento, forman un sistema robusto que logró la retención de carga termoestable así como la liberación efectiva después de la exposición a dosis clínicamente relevantes de la radiación NIR. La liberación podría ajustarse variando el dopaje con porfirina, el tiempo de irradiación láser y la potencia de irradiación láser. Esto representa una desviación de los sistemas de liberación desencadenados externamente que dependen del calentamiento a unos pocos grados por encima de la temperatura corporal y pueden

tener problemas con la estabilidad a temperaturas fisiológicas. En respuesta a la irradiación NIR, los liposomas de PoP de la presente divulgación liberaron su carga con un control robusto espacial y temporal y cuando se cargan con agentes apropiados proporcionan opciones eficaces de diagnóstico y tratamiento.

### 5 EJEMPLO 3

Este ejemplo describe además la preparación de liposomas de PoP sin PEG-lípido, carga, y la liberación de la carga.

10 Elegimos caracterizar los liposomas de PoP que carecen de PEG-lípido para ver si había una liberación desencadenada por luz mejorada en los liposomas de PoP. Además, la inmunogenicidad de PEG-lípido se ha identificado como una posible preocupación en los pacientes. Los liposomas de PoP se prepararon con DSPC, DOPC, colesterol y pirofosfolípido (relación molar, 59,7-x: x: 40: 0,3, x = % en moles de DOPC). Se reemplazó DSPC con DOPC en un rango de 0-10% en moles y se evaluaron los efectos sobre la liberación desencadenada por luz bajo irradiación con luz infrarroja cercana (NIR) de 665 nm (**Figura 21A, 21B**). La inclusión de solo 2% en moles de DOPC aceleró la liberación desencadenada por la luz, lo que resultó en una disminución de 11,6 veces (713 segundos frente a 61 segundos) en el tiempo requerido para liberar el 50% de Dox. Cantidades crecientes de DOPC (más del 3% en moles) aumentaron aún más las velocidades de liberación y los liposomas con DOPC al 5% en moles liberaron el 50% de Dox cargado en 43 segundos. La estabilidad sérica de los liposomas de PoP cargados con Dox con diversas cantidades de DOPC reveló que los liposomas de PoP con un contenido de DOPC superior al 5% en moles no eran estables cuando se incubaron en suero bovino al 50 % a 37 °C durante 4 h, lo que provocó una pérdida del 22 % y 42 % de Dox al 7% en moles y al 10% en moles de DOPC, respectivamente (**Figura 21C**). Por tanto, se seleccionó el 5% en moles de DOPC ya que permitió una liberación rápida desencadenada por la luz y una buena estabilidad en suero en ausencia de irradiación NIR (solo liberación de Dox ~ 10% en suero bovino al 50% en 4 h). Demostramos previamente que la eficacia de carga de Dox para liposomas que contienen 2% en moles de piro-fosfolípido era de aproximadamente 50% sin la inclusión de PEG-lípido. Curiosamente, la incorporación de DOPC permitió una eficacia de carga de Dox de ~ 95% en liposomas de PoP que carecen de PEG-lípido (**Figura 27**). Sin embargo, cuando la cantidad de pirofosfolípidos se redujo a menos del 0,5% en moles, se lograron altas eficiencias de carga de Dox sin DOPC (eficiencia de carga del 97,3% para la formulación con 0% en moles de DOPC en la **Figura 21A**). La inclusión de 5% en moles de PEG-lípido redujo la velocidad de liberación desencadenada por la luz en los liposomas de PoP que contienen DOPC (336 s frente a 46 s para la liberación del 50% de Dox, **Figura 28**).

Usando una pequeña cantidad de DOPC (5% molar), se logró una liberación rápida de Dox usando menos de 1% molar de PoP (**Figura 21D**). Los tiempos de irradiación necesarios para alcanzar el 50% de liberación de Dox fueron inferiores a 30 s para los liposomas que contenían 0,5-1% en moles de PoP. ~90% de Dox podía liberarse en 60 s para liposomas que contenían 0,3% molar o más de PoP (**Figura 21E**). El aumento de la cantidad de PoP mejora la liberación de carga desencadenada por la luz; sin embargo, la administración de fotosensibilizadores a los pacientes también aumenta el riesgo de efectos secundarios potencialmente fototóxicos. Por lo tanto, se seleccionó PoP al 0,3 % molar para una investigación adicional, ya que ofrecía la cantidad mínima de PoP utilizada y liberaba rápidamente contenidos en 60 s. A menos que se indique lo contrario, la formulación final utilizada para los estudios posteriores fue [DSPC:DOPC:Colesterol: PoP], [54,7: 5: 40: 0,3, % molar] con una relación molar de fármaco a lípido de 1:8.

La liberación Dox a tasas de fluencia inferiores (25 mW/cm<sup>2</sup> a 250 mW/cm<sup>2</sup>) se evaluó en suero bovino al 50 % a 37 °C (**Figura 29A**). A bajas tasas de fluencia (25 mW/cm<sup>2</sup>), se observó una liberación de Dox del 57% en 2 min de irradiación NIR. El tiempo requerido para alcanzar el 90% de liberación de Dox no fue lineal (**Figura 29B**), por lo que la energía total requerida para alcanzar el 90% de liberación no fue constante. Esto contrasta con nuestra observación anterior de que los liposomas sin DOPC liberan carga con una cantidad constante de energía independientemente de la tasa de fluencia. La fluencia requerida para una liberación del 90% estaba en una relación lineal con la tasa de fluencia, con menor energía total requerida a menor tasa de fluencia (**Figura 29C**). Esto sugiere que existe un mecanismo alternativo en los liposomas de PoP que contienen DOPC. Como la generación de oxígeno singlete es menos eficiente a tasas de fluencia más altas debido al agotamiento de oxígeno, planteamos la hipótesis de que el mecanismo de liberación podría estar relacionado con la generación de oxígeno singlete durante la irradiación.

La liberación desencadenada por luz mejorada está relacionada con el oxígeno singlete. Tras la irradiación de luz en presencia de oxígeno, los fotosensibilizadores (PoP en este caso) pueden generar oxígeno singlete reactivo. Se sabe que las membranas celulares son una diana del oxígeno singlete en la terapia fotodinámica. Se planteó la hipótesis de que la rápida liberación desencadenada por la luz observada estaba relacionada con la generación de oxígeno singlete. Para probar esto, se utilizó el sensor de oxígeno singlete fluoróforo informador verde (SOSG) para detectar la presencia de oxígeno singlete durante la irradiación de liposomas. El antioxidante ascorbato de sodio y el atrapador de oxígeno molecular sulfito de sodio se utilizaron para inhibir la generación de oxígeno singlete. Bajo irradiación NIR, los liposomas de PoP generaron oxígeno singlete, pero esto fue inhibido por ascorbato y sulfito (**Figura 22A**). La liberación de Dox de los liposomas de PoP se inhibió en presencia de ascorbato 5 mM (**Figura 22B**). No se observó liberación de Dox en ausencia de tratamiento con luz, con o sin ascorbato de sodio. El tratamiento con luz de los liposomas de PoP cargados con Dox indujo una liberación de Dox del 95% en 3 min, pero la inclusión de ascorbato de sodio 5 mM condujo a una reducción del 81% en la liberación de Dox. De manera similar, la liberación de Dox desencadenada por luz en presencia de sulfito de sodio 25 mM se redujo en un 80% (**Figura 22C**).

Se examinó la liberación desencadenada por la luz de los liposomas de PoP cargados con Dox que contenían diferentes fosfolípidos insaturados, incluidos 18:1 (cis) PC (DOPC), 18:2 (cis) PC y 18:0-18:2 PC (**Figura 22D**). Otros fosfolípidos insaturados también mejoraron la liberación de Dox de los liposomas de PoP tras la irradiación. Los lípidos con mayor grado de insaturación indujeron una liberación más rápida (**Figura 22E**). Bajo luz NIR, los liposomas con 18:2 (cis) PC (4 enlaces insaturados) liberaron el 50% de Dox en 31 segundos, mientras que ese tiempo aumentó a 46 segundos para los liposomas que contenían 18:1 (cis) PC (2 enlaces insaturados). Aunque 18:2 (cis) PC dio como resultado una liberación más rápida en comparación con 18:1 (cis) PC, los liposomas de PoP que contienen 18:2 (cis) PC demostraron una menor eficiencia de carga (75% de eficiencia de carga, Tabla 2). Curiosamente, 18:0-18:2 PC tiene el mismo grado de insaturación que 18:1 (cis) PC, sin embargo, la velocidad de liberación desencadenada por luz fue más lenta, logrando una liberación de Dox del 50% en 116 segundos. Esto podría deberse a una menor probabilidad de que el oxígeno singlete acceda a los enlaces insaturados de 18:0-18:2 PC que están en la misma cadena. Estudios posteriores demostraron que la configuración química del lípido insaturado era crítica, ya que la (trans) 18:1 PC no mostró una mejora obvia en la liberación desencadenada por la luz (**Figura 30A**). Se requirió irradiación durante 505 segundos para alcanzar una liberación de Dox del 50% en (trans) 18:1 PC, en comparación con 31 segundos para (cis) 18:1 PC (**Figura 30B**). Pueden aparecer defectos locales o desestabilización durante este proceso y, en última instancia, ayudar a la ruptura de las bicapas lipídicas por 18:1 (cis) PC, pero no 18:1 (trans) PC.

**Tabla 2: Caracterización de liposomas de PoP que contienen lípidos insaturados**

Lípidos insaturados	Tamaño (nm)	PDI	Eficacia de carga (%)
18:0-18:2 (cis) PC	114,3 ± 1,6	0,04 ± 0,02	98,2 ± 0,85
18:2 (cis) PC	108,2 ± 0,05	0,07 ± 0,02	75,3 ± 2,5
18:1 (trans) PC	114,35 ± 3,5	0,06 ± 0,02	96,2 ± 0,56

Los datos muestrans media ± DE, n = 3

La oxidación de DOPC durante la liberación desencadenada por luz. El oxígeno singlete puede provocar la oxidación de los fosfolípidos insaturados y el colesterol. El contenido de DOPC de los liposomas de PoP antes y después de la irradiación NIR (310 mW/cm<sup>2</sup> durante 4 min) se evaluó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS). El 96% de DOPC se eliminó después de la irradiación (**Figura 23A**) y se identificaron tres especies oxidadas relacionadas con DOPC (m/z: 832,5814, 834,5927 y 850,5806; grupos cabezas de fosfolípidos confirmados, **Figura 23B** y **Figura 31A**). Además de estas especies relacionadas con DOPC, también se identificaron 2 especies oxidadas relacionadas con el colesterol (m/z: 367,3388, 383,3298, **Figura 31B**). La cinética de oxidación de DOPC bajo irradiación NIR mostró que el 85% de DOPC se oxidó después de 1 min, un punto de tiempo en el que se liberó ~90% de Dox cargado (**Figura 23C**). La DOPC se oxidó adicionalmente con una irradiación NIR prolongada y el 99% de la DOPC se oxidó después de 4 min. La cantidad de DSPC permaneció constante durante el transcurso de la irradiación (datos no mostrados). En la **Figura 23D** se presenta una posible estructura lipídica con 9-hidroperóxidos que coinciden con la masa correcta de las especies oxidadas con DOPC observadas (m/z 850,5806). El oxígeno singlete reacciona con el carbono en cualquier extremo de un doble enlace mediante adición concertada (o reacción "eno") y produce un hidroperóxido alílico en la configuración trans. Es probable que ambas cadenas laterales de DOPC se hayan oxidado, formando una mezcla de 9- y 10-hidroperóxidos. Los hidroperóxidos lipídicos no son especies estables y propensos a oxidación secundaria. Se detectó una variación relativamente alta de especies oxidadas de DOPC (**Figura 25A**), mientras que las especies oxidadas de colesterol (**Figura 31B**) fueron relativamente consistentes.

La formación de hidroperóxidos alílicos puede conducir a una disminución de las interacciones hidrofóbicas que mantienen la integridad del liposoma y probablemente provocó la aceleración de pérdidas y la liberación de Dox (**Figura 23E**). Estudios posteriores revelaron que en el caso de los liposomas sin DOPC, la capacidad de los liposomas de PoP para liberar carga tras la irradiación con NIR dependía de la oxidación del colesterol. Los liposomas de PoP que carecen tanto de colesterol como de DOPC no pudieron liberar eficazmente los colorantes encapsulados (**Figura 32A**), pero la inclusión de colesterol permitió la liberación desencadenada por luz. El atrapador de oxígeno sulfito de sodio inhibió la liberación de colorante inducida por la luz (**Figura 32B**).

La oxidación de lípidos tras la irradiación con NIR fue inhibida por ascorbato de sodio (un antioxidante que se muestra que inhibe la liberación desencadenada por la luz en la **figura 22B**), según se controló mediante LC-MS. En ausencia del antioxidante, solo el 18% de la DOPC intacta permaneció después de la irradiación. La pérdida de DOPC desencadenada por NIR se inhibió en presencia de ascorbato, quedando el 72% de DOPC después de la irradiación (**Figura 24A**). En presencia de ascorbato de sodio, las especies oxidadas relacionadas con DOPC se redujeron al 5% en comparación con las muestras sin ascorbato de sodio (**Figura 24B**). La generación de especies oxidadas relacionadas con el colesterol también disminuyó a solo ~ 10% en presencia de ascorbato (**Figura 24C**). Tomado junto con la dependencia de DOPC para mejorar la liberación desencadenada por luz, estos resultados sugieren que la oxidación de DOPC por oxígeno singlete era responsable del aumento de la liberación de Dox tras la irradiación con NIR.

Permeabilización transitoria de liposomas de PoP tras irradiación NIR. Anteriormente se informó que las membranas de liposomas de PoP solo se permeabilizan temporalmente, basándonos en la observación de que con la exposición a la luz NIR, la calceína externa se puede cargar en el núcleo de los liposomas. Sin embargo, para los liposomas de PoP que contienen DOPC, el componente lipídico insaturado se oxida de manera irreversible, por lo que la

permanencia de la permeabilización de la membrana fue de interés. El tamaño y el índice de polidispersidad (PDI) se registraron antes y después de la irradiación (**Figura 25A y 25B**). El tamaño de los liposomas aumentó con significación estadística (105 nm frente a 119 nm,  $P < 0,05$ ) después del tratamiento con luz, aunque esto puede considerarse un cambio modesto en el diámetro de los liposomas. El PDI aumentó, pero el cambio no fue estadísticamente significativo (0,046 frente a 0,096). Por lo tanto, los cambios de tamaño físico que se produjeron en los liposomas durante la irradiación fueron sutiles. Los colorantes solubles en agua, tales como la calceína, podrían cargarse pasivamente en liposomas de PoP vacíos bajo irradiación NIR. Esto se refleja en la relación de fluorescencia calceína:PoP de 0,77 en las fracciones que contienen liposomas tras la eliminación del colorante libre mediante cromatografía de filtración en gel (**Figura 25C**). En estas condiciones, los liposomas no irradiados tenían una relación de fluorescencia calceína:PoP cercana a 0. Curiosamente, cuando se agregó calceína a los liposomas de PoP vacíos después de la irradiación NIR (a diferencia de antes, que es como se realizaba normalmente el ensayo), la calceína se encapsuló en liposomas de PoP vacíos preirradiados (relación calceína/PoP 0,49). Esto sugiere que los liposomas de PoP que contenían DOPC irradiados no se volvieron a sellar por sí mismos inmediatamente después de la irradiación y la permeabilización transitoria de la membrana fue persistente. Para investigar si los liposomas preirradiados se volvían a sellar, se añadió calceína a los liposomas de PoP que contenían DOPC vacíos preirradiados en diferentes puntos de tiempo después de la irradiación. Tal como se muestra en la **Figura 25D**, la cantidad de calceína encapsulada disminuyó con el tiempo, y la relación de fluorescencia calceína:PoP disminuyó desde que la calceína se agregó inmediatamente después de la irradiación NIR en un 45% a los 10 minutos después de la irradiación y en un 82% a los 60 minutos después de la irradiación. Por tanto, los liposomas de PoP preirradiados parecían volverse a sellar gradualmente con el tiempo, evitando que la calceína se encapsulase. Esto se verificó además en otro experimento en el que se añadió calceína a los liposomas de PoP vacíos inmediatamente después de la irradiación y a continuación se incubó durante 0, 1, 10, 30 y 60 min a temperatura ambiente. La incubación prolongada de liposomas de PoP vacíos preirradiados en presencia de calceína condujo a una encapsulación de calceína mejorada (**Figura 25E**). La mayor parte de la carga desencadenada por la luz se produjo en los puntos de tiempo anteriores con un pequeño aumento adicional después de 30 min, lo que sugiere que la reorganización y el resellado de la membrana se produjeron en aproximadamente 10 min. Dado que los liposomas irradiados reformaron las estructuras de la membrana que estaban suficientemente intactas para retener la calceína sobre una columna de filtración en gel, investigamos si los liposomas preirradiados podían cargar activamente Dox. La carga activa de Dox era ineficiente (~2% de Dox cargado) para liposomas de PoP cargados preirradiados con NIR en sulfato de amonio (figura 33), lo que sugiere que los liposomas de PoP con DOPC y colesterol oxidados no eran estables suficientemente para mantener un gradiente interno de sulfato de amonio (durante diálisis) que es requerido para cargar Dox activa.

Evaluación in vivo. Los liposomas de PoP que contienen DOPC cargados con Dox preparados tenían aproximadamente 120 nm y forma esférica (**Figura 34A y 34B**). Los liposomas se mantuvieron estables en almacenamiento a 4 °C (protegidos de la exposición a la luz) durante al menos 3 meses. No se observaron pérdidas de fármaco discernibles, cambios de tamaño o índice de polidispersidad (**Figura 34C, 34D y 34E**). Para los estudios farmacocinéticos, se inyectaron liposomas por vía intravenosa en ratones CD-1 a una dosis de Dox de 10 mg/kg (**Figura 26A**). Se observó una vida media circulante de 8,3 horas para esta formulación libre de PEG (relación molar [DSPC: DOPC: Chol: PoP] de [54.7: 5: 40: 0.3]), que fue más corta que la vida media de 21,9 horas de una formulación de liposomas de PoP oculta PEGilada (relación molar [DSPC: PEG-lípido: Col: PoP] de [53: 5: 40: 2]) que informamos recientemente [6]. Con la misma dosis de inyección, los liposomas de PoP no pegilados exhibieron solo la mitad de la concentración sérica máxima de Dox (119 frente a 250 µg/ml) 0,5 h después de la inyección, un tercio del tiempo de residencia medio (MRT, 9,6 frente a 29,3 h) y el 18% del área bajo la curva (AUC, 851 vs 4.837 µg · h/ml) en comparación con liposomas de PoP ocultos PEGilados. La tasa de depuración de los liposomas de PoP libres de PEG fue 6 veces más rápida (0,012 frente a 0,002 ml/h/g) y el volumen de distribución en estado estacionario fue 18,8 veces mayor que el de los liposomas de PoP PEGilados.

Se utilizó un modelo dual de tumor para evaluar la acumulación de Dox inducida por quimioterapia en los tumores, con un flanco de tumor irradiado y el otro utilizado como un control no irradiado. Se determinó la captación tumoral de Dox inmediatamente después del tratamiento con láser (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 40 min) (**Figura 26B**). Se logró un aumento de 5,6 veces de la acumulación de Dox tumoral en los tumores irradiados, en comparación con los tumores no irradiados. Sin embargo, la cantidad de acumulación de Dox tanto en los tumores no irradiados como en los irradiados (0,5 vs 1,0 µg/g, 2,6 vs 7,0 µg/g, respectivamente) fue menor en comparación con los liposomas de PoP PEGilados previamente descritos a una dosis de inyección de 5 mg/kg. Los tiempos de circulación más cortos para los liposomas no PEGilados podrían ser un factor que contribuya a la disminución de la deposición. Además, PoP también puede inducir un efecto de permeabilización vascular mediado por fotodinámica, que podría contribuir a la acumulación mejorada de terapias a nanoescala. Por lo tanto, la dosis más baja de PoP (0,3 vs 2% en moles) en los liposomas no PEGilados y los menores efectos de daño vascular del tumor son probablemente la razón de la acumulación relativamente baja de Dox en los tumores irradiados. La distribución de Dox en órganos clave se determinó inmediatamente después del tratamiento con láser y reveló que la mayor parte de Dox estaba en riñón, bazo e hígado, con una cantidad sustancial de liposomas de PoP cargados con Dox que permanecían en circulación después del tratamiento con luz (**Figura 35A**).

Se evaluó la eficacia antitumoral de los liposomas de PoP cargados con Dox (Dox-PoP) que contenían 5% en moles de DOPC en ratones que llevaban xenoinjertos MIA PaCa-2 (**Figura 26C**). 6 mg/kg de liposomas Dox-PoP con

tratamiento con luz fue significativamente más efectivo que la misma dosis de liposomas con Dox-PoP sin tratamiento con luz (mediana de supervivencia de 80,5 vs 22,5 días, \*\*\* P <0,001), o liposomas de PoP vacíos con tratamiento con luz (mediana de supervivencia de 80,5 frente a 24,5 días, \*\*\* P <0,001). 6 mg/kg de liposomas con Dox-PoP sin irradiación de luz retrasaron ligeramente el crecimiento del tumor en comparación con el control con solución salina (mediana de supervivencia 22,5 frente a 19 días, \* P <0,05). La dosis equivalente de liposomas de PoP vacíos con tratamiento con láser también fue marginalmente eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina (mediana de supervivencia 24,5 días frente a 19 días, \*\* P <0,01). La eficacia mejorada de los liposomas con Dox-PoP con tratamiento de luz, en comparación con las otras dos monoterapias (quimioterapia con Dox-PoP solo o terapia fotodinámica equivalente con liposomas de PoP vacíos) podría deberse a la mayor acumulación de fármaco tumoral debido a la liberación de fármaco y los efectos sinérgicos de la quimioterapia y la terapia fotodinámica.

Dada la eficacia de la quimofototerapia de tratamiento único, se realizó una respuesta a la dosis de liposomas con Dox-PoP con luz (**Figura 26D**). Los liposomas con Dox-PoP a una dosis de Dox de solo 2 mg/kg con tratamiento con láser inhibieron el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina (mediana de supervivencia de 23,5 frente a 19 días, \* P <0,05). Los liposomas con Dox-PoP de 4 mg/kg no fueron significativamente más efectivos que los de 2 mg/kg (mediana de supervivencia de 28 frente a 23,5 días). Los liposomas con Dox-PoP de 6 mg/kg fueron significativamente más efectivos que 4 mg/kg (mediana de supervivencia de 80,5 frente a 28 días, \*\* P <0,01), con 2 de 6 ratones curados permanentemente (33% de tasa de curación). Según los datos del volumen del tumor, el día 19 después del fototratamiento, los liposomas con Dox-PoP de 2 mg/kg no inhibieron de manera estadísticamente significativa el crecimiento tumoral en comparación con la solución salina, mientras que los liposomas con Dox-PoP de 4 mg/kg fueron eficaces en el control del crecimiento tumoral (\* P <0,05). Los liposomas con Dox-PoP de 6 mg/kg fueron significativamente más potentes que los liposomas con Dox-PoP de 4 mg/kg (\* P <0,05). Tomados en conjunto, los liposomas de 4 mg/kg fueron efectivos en la inhibición del crecimiento tumoral, y los liposomas con Dox-PoP de 6 mg/kg fueron más efectivos y se pudo lograr una tasa de curación del 33%. La masa corporal de los ratones no reveló pérdida de peso durante el transcurso del tratamiento (**Figura 35B, 35C**). No hubo un calentamiento significativo durante el tratamiento con láser, ya que la temperatura de la superficie del tumor no superó los 40 °C según las mediciones con una cámara térmica (datos no mostrados).

Conclusión. La incorporación de lípidos insaturados, incluido DOPC, en los liposomas de PoP aceleró drásticamente la liberación desencadenada por luz NIR. Esto permitió el uso de cantidades muy bajas de PoP (0,1 - 0,3% en moles) para desencadenar una liberación por luz rápida mientras se conservaba la estabilidad en suero en ausencia de irradiación NIR. El mecanismo de la velocidad de liberación por luz mejorada se relacionó con la oxidación de DOPC por el oxígeno singlete. En el caso de los liposomas de PoP sin DOPC, la oxidación del colesterol condujo a la liberación de carga desencadenada por la luz. La inhibición tumoral utilizando xenoinjertos MIA Paca-2 demostró una excelente eficacia de quimofototerapia. La estrategia de combinar pequeñas cantidades de fosfolípidos insaturados junto con fotosensibilizadores insertados en bicapas de manera estable (tales como PoP) es una estrategia útil para inducir la liberación intravascular rápida desencadenada por luz de agentes terapéuticos.

Experimental.

**Materiales:** 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), colesterol, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:1 ( $\Delta$ 9-cis) PC o DOPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] (MPEG-2000-DSPE, PEG-lípido o PEG) se obtuvieron de Corden Pharma. (1,2-dilnoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:2 (cis) PC), 1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:0-18:2 PC) y 1,2-dielaidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (18:1 (trans) PC) se obtuvieron de Avanti Polar Lipids. Otros productos químicos se obtuvieron de Sigma, a menos que se indique lo contrario. El PoP utilizado fue pirofosfolípido y se sintetizó como se ha descrito previamente.

**Preparación de liposomas:** A menos que se indique lo contrario, se prepararon diversas formulaciones de liposomas mediante el mismo procedimiento que se describe en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, la formulación de liposomas de PoP finalizada en este estudio fue [DSPC: DOPC: Colesterol: PoP], [54,7: 5: 40: 0,3], % molar, con una relación molar de fármaco a lípido 1:8. Para generar 5 mL de liposomas de PoP (20 mg/mL de lípidos totales) de las formaciones indicadas, los lípidos se disolvieron en 1 mL de etanol a 60 °C, seguido de la inyección de 4 mL de tampón de sulfato de amonio 250 mM (pH 5,5) a 60°C. Las soluciones de liposomas se pasaron a continuación 10 veces a 60°C a través de membranas de policarbonato apiladas secuencialmente de un tamaño de poro de 0,2, 0,1 y 0,08  $\mu$ m usando una extrusora de nitrógeno de alta presión (Northern Lipids). El sulfato de amonio libre se eliminó mediante diálisis en una solución de 800 ml compuesta de sacarosa al 10% e histidina 10 mM (pH 6,5) con al menos 2 cambios de búfer. Para los liposomas de PoP cargados con sulforrodamina (SRB), los lípidos de las formulaciones indicadas se disolvieron en etanol y se hidrataron con SRB 50 mM, se sonicaron a 45 °C durante 30 min. Las fracciones de liposomas se recogieron mediante un procedimiento de filtración en gel.

**Carga de la carga y caracterización de liposomas de PoP:** Se cargó doxorubicina (Dox, LC Labs # D-4000) mediante el procedimiento de gradiente de sulfato de amonio. Se añadió Dox con una relación molar de fármaco a lípido de 1:8 a las soluciones de lípidos y se incubó a 60°C durante 1 h. Los tamaños de los liposomas y el índice de polidispersidad se determinaron mediante dispersión de luz dinámica en PBS. La eficacia de la carga de Dox se determinó pasando 20  $\mu$ l de liposomas (20 mg/ml de lípidos) diluidos en 1 ml de PBS por una columna Sephadex G-75. Se recogieron 24

fracciones x 1 ml y se midió la fluorescencia de Dox en cada fracción usando un lector de microplacas de fluorescencia TECAN Safire (longitudes de onda de excitación y emisión de 480 nm y 590 nm, respectivamente). La eficacia de carga se determinó como el porcentaje de fármaco en las fracciones que contienen liposomas (primeras 3-8 fracciones). Se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) con tinción negativa utilizando un microscopio electrónico JEM-2010 con tinción con acetato de uranilo al 1%. La estabilidad del suero se realizó incubando liposomas de PoP (20 mg/ml de lípidos) diluidos 200 veces en suero bovino estéril al 50 % (Pel-Freeze) a 37°C durante los tiempos indicados. Se añadió Triton X-100 al 0,25% para leer la fluorescencia de Dox total. La liberación de Dox se midió por fluorescencia usando la fórmula: % de liberación de Dox =  $(F_{\text{final}} - F_{\text{inicial}}) / (F_{\text{x-100}} - F_{\text{inicial}}) \times 100\%$ .

10 *Liberación del fármaco desencadenada por luz:* se realizaron experimentos de liberación desencadenada por luz con un diodo láser de 665 nm de potencia ajustable (RPMC Lasers) a la tasa de fluencia indicada (310 mW/cm<sup>2</sup> o 250 mW/cm<sup>2</sup>, tal como se indica). La liberación de Dox se registró en tiempo real en un fluorómetro (PTI). La irradiación se realizó con liposomas de PoP (20 mg/ml de lípidos) diluidos 600 veces en suero bovino estéril al 50% (Pel-Freeze) a 37°C. La temperatura se midió insertando una sonda de termopar tipo K directamente en la solución irradiada. Se añadió Triton X-100 al 0,25% después de la irradiación con láser para leer la fluorescencia total. La liberación de Dox se evaluó midiendo la fluorescencia de Dox antes y después del tratamiento con la fórmula: % de liberación de Dox =  $(F_{\text{final}} - F_{\text{inicial}}) / (F_{\text{x-100}} - F_{\text{inicial}}) \times 100\%$ . La inhibición de la liberación de Dox por ascorbato de sodio se realizó en una microplaca de 96 con 2 µL de liposomas de PoP (20 mg/ml de lípidos) diluidos 100 veces en PBS que contenía ascorbato de sodio 5 mM. Las muestras se irradiaron a 250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min. La inhibición de la liberación de Dox por sulfito de sodio se realizó en una cubeta con 5 µL de liposomas de PoP (20 mg/ml de lípidos) diluidos 600 veces en PBS que contenía sulfito de sodio 25 mM. Las muestras se irradiaron a 310 mW/cm<sup>2</sup>.

25 *Determinación del oxígeno singlete:* Se empleó reactivo verde sensor de oxígeno singlete (SOSG) (Life Technologies # S-36002) para la detección de oxígeno singlete generado por piro-fosfolípido durante la irradiación. Se registró la fluorescencia de SOSG (exc./em. 504 nm/525 nm) durante la irradiación en un fluorómetro (PTI). La irradiación de luz se realizó en PBS que contenía SOSG 500 nM y liposomas de PoP cargados con Dox (PoP 420 nM). Se empleó PBS que contenía ascorbato de sodio 5 mM o sulfito de sodio 25 mM para inhibir la generación de oxígeno singlete.

30 *Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS):* Se diluyeron liposomas de PoP cargados con Dox (20 mg/ml de lípidos, [DSPC: DOPC: Colesterol: PoP], [54,7: 5: 40: 0,3], % en moles) 100 veces en PBS y se irradiaron (310 mW/cm<sup>2</sup>) durante 0,5, 1, 2, 4 min para la cinética de oxidación. Para la inhibición de la oxidación, las muestras se irradiaron durante 4 min a 310 mW/cm<sup>2</sup> en PBS que contenía ascorbato de sodio 5 mM. A continuación, se extrajo 1 ml de liposomas tratados con una solución de metanol:cloroformo 1:2 (v/v). Se recogió la capa orgánica y se volvió a extraer la capa acuosa. Las capas orgánicas se combinaron y se secaron al vacío y se almacenaron a -80 °C. Los lípidos se recuperaron en cloroformo para uso en LC-MS. La adquisición de datos de LC-MS se realizó utilizando LC-ESI-QTOF [HPLC Agilent 1260 acoplada a un instrumento Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.)] en modo de ionización por electropulverización positiva. La separación cromatográfica se logró utilizando una columna de fase inversa Luna C5 (5 µm, 4,6 mm x 50 mm, Phenomenex) con un cartucho protector de fase inversa C5. Las fases móviles A y B fueron 95:5 de agua: metanol (v/v) y 60: 35: 5 de isopropanol: metanol: agua, respectivamente. Cada fase móvil se complementó con ácido fórmico al 0,1% (v/v) y formiato de amonio 5 mM. El gradiente comenzó después de 3 min a 0% B ya continuación aumentó a 100% B durante 10 min seguido de 100% B durante 7 min antes del equilibrio durante 8 min a 0% B. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. Se utilizó una fuente de ionización por electropulverización (ESI) equipada con DualJSI. Los voltajes capilar y fragmentador se establecieron en 3500 y 175 V. La temperatura del gas de secado fue de 350 °C con un caudal de 12 L/min. Los datos se recopilaron utilizando un rango de m/z de 50-1700 en rango dinámico extendido.

50 Para el análisis dirigido, el m/z correspondiente para cada ion (para DOPC m/z = 786,6007, [M + H]<sup>+</sup>, y para DSPC m/z = 790,6320, [M + H]<sup>+</sup>) se extrajo en MassHunter Qualitative Analysis (versión B.06.00, Agilent Technologies). Las áreas de los picos para cada ión en el cromatograma de iones extraídos se integraron manualmente y se presentaron como recuentos de iones. DOPC y DSPC fueron confirmados por sus patrones de fragmentación MS/MS. Los experimentos de MS/MS se llevaron a cabo de manera similar. Se utilizaron diferentes energías de colisión para obtener una ionización óptima. Se observaron patrones de fragmentación a 15 V, 35 V y 55 V. Para identificar las especies emergentes después de la irradiación, los datos brutos obtenidos se importaron a MassHunter Profinder (versión B.06.00, Agilent Technologies) para la alineación de los picos. El análisis estadístico y el filtrado de las especies recientemente identificadas se llevaron a cabo en Mass Profiler Professional (MPP, versión 12.6.1, Agilent Technologies).

60 *Encapsulación de calceína inducida por luz:* 10 µl de liposomas de PoP vacíos (20 mg/ml de lípidos) se diluyeron 20 veces en PBS en un pocillo de la microplaca. La irradiación con láser se realizó a 665 nm y 250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min a temperatura ambiente. Se añadió calceína (50 mM) antes o después de la irradiación, tal como se indica. Las muestras de liposomas se cargaron en una columna Sephadex G-75 inmediatamente después del tratamiento (**Figura 25C**). Para la cinética de encapsulación de calceína en liposomas de PoP vacíos preirradiados, se añadió calceína inmediatamente después, 1 min, 10 min, 30 min o 60 min después de la irradiación. A continuación, se añadieron muestras a las columnas G-75 después de la incubación a temperatura ambiente durante 3 min (**Figura**

25D). Alternativamente, se añadió calceína antes de la irradiación (250 mW/cm<sup>2</sup> durante 3 min) y se incubó a temperatura ambiente durante 0 min, 1 min, 10 min, 30 min y 60 min (**Figura 25E**). La eficacia de encapsulación de calceína se determinó mediante filtración en gel con una columna Sephadex G-75. Se recogieron 16 fracciones de 0,5 ml, se leyeron la fluorescencia de calceína (485 nm/525 nm) y PoP (420 nm/670 nm) con un lector de microplacas de fluorescencia TECAN Safire. Las proporciones de calceína/PoP en las fracciones liposomales (6-9 fracciones) se calcularon mediante división simple.

*Farmacocinética y biodistribución:* se inyectaron intravenosamente ratones hembra (hembra CD-1, 18-20 g, Charles River) a través de la vena de la cola con liposomas de PoP que contienen DOPC cargado con Dox (10 mg/kg Dox), n = 4. Se tomaron muestras de pequeños volúmenes de sangre en las localizaciones submandibular y retroorbitaria a las 0,5, 2, 4, 10, 24 y 28 h después de la inyección. La sangre se centrifugó a 1.500 xg durante 15 min. Se recogieron 10 µl de suero y se diluyeron 100 veces en tampón de extracción (HCl 0,075 N, isopropanol al 90%). Las muestras se almacenaron a -20 ° C durante la noche. Las muestras se retiraron y se centrifugaron durante 15 min a 10.000 xg. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron por fluorescencia. Las concentraciones de Dox se determinaron mediante una curva estándar. Los parámetros farmacocinéticos no comparativos fueron analizados mediante PKsolver.

Para la biodistribución, se inocularon ratones desnudos hembra (laboratorios Jackson, # 007850) con 5 × 10<sup>6</sup> células MIA Paca-2 en ambos flancos (n = 4). 10 min después de la inyección intravenosa con 6 mg/kg de liposomas de PoP que contienen DOPC cargados con Dox, los ratones se anestesiaron mediante la inhalación de isoflurano y los tumores (8-10 mm) en un flanco se irradiaron a 250 mW/cm<sup>2</sup> durante 40 min, los tumores en el otro flanco se utilizaron como controles no irradiados. Los ratones se sacrificaron inmediatamente después de la irradiación. Los tumores y órganos clave se recogieron y lavaron en PBS, se pesaron y homogeneizaron en tampón de lisis nuclear [0,25 mol/L de sacarosa, 5 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de MgSO<sub>4</sub>, 1 mmol/L, CaCl (pH 7,6)]. Se extrajo Dox durante la noche en HCl 0,075 N con isopropanol al 90% y se cuantificó como se ha descrito anteriormente.

*Inhibición del crecimiento del tumor.* Se inocularon ratones desnudos hembra de cinco semanas de edad (Jackson Labs, # 007805) con 5 × 10<sup>6</sup> células MIA Paca-2 en un flanco. Cuando los tamaños de los tumores alcanzaron 6-8 mm, los ratones se agruparon aleatoriamente en cuatro grupos con 5-6 ratones por grupo: (1) Dox-PoP con láser; (2) PoP vacío con láser; (3) Dox-PoP sin láser; (4) Solución salina. Se inyectaron por vía intravenosa 200 µl de Dox-PoP (6 mg/kg de Dox, 0,25 mg/kg de PoP) o liposomas de PoP vacíos (0,25 mg/kg de PoP) a través de la vena de la cola. Para el experimento de respuesta a la dosis, se incluyeron otros dos grupos Dox-PoP (2 mg/kg Dox) + láser o Dox-PoP (4 mg/kg Dox) + láser. 10 minutos después de la inyección intravenosa, se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano. Los tumores irradiados se trataron con láser de 665 nm a 250 mW/cm<sup>2</sup> durante 40 min (600 J/cm<sup>2</sup>). Las temperaturas de los tumores durante el tratamiento con láser se controlaron con una cámara térmica. Los tamaños de los tumores se registraron 2-3 veces por semana midiendo las tres dimensiones del tumor usando un calibrador. Los volúmenes tumorales se calcularon con la fórmula del elipsoide: Volumen = π · L · W<sup>2</sup>/6, en la que L y W son la longitud y anchura del tumor, respectivamente. Se controlaron los pesos corporales de los ratones durante cuatro semanas. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió 10 veces el volumen inicial o al final del período de estudio (90 días).

*Análisis estadístico.* Los datos se analizaron por GraphPad Prism (versión 5.01). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Merier se analizaron con la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox). La mediana de supervivencia se definió como el tiempo en el que la curva de supervivencia escalonada cruza el 50% de supervivencia. Las curvas de volumen tumoral se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a P <0,05. (\* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001).

#### EJEMPLO 4

Este ejemplo describe además la preparación de liposomas de PoP con diferentes PoP, carga de los liposomas de PoP y liberación selectiva/secuencial de carga de liposomas de PoP.

El desarrollo de diferentes tipos de PoP para liposomas de PoP activados por la luz. Se desarrolló un nuevo tipo de PoP basado en purpurina-18, que difiere en estructura del pirofosfolípido basado en el anillo exocíclico (**Figura 36a**). La purpurina-18 está disponible comercialmente y se esterificó fácilmente al liso-lípido. La pureza de purpurina-PoP fue superior al 95% y la identidad se confirmó con espectrometría de masas. Ambos liposomas de piro- y purpurina-PoP podrían formarse con una relación molar de PoP:PEG-lípido:CHOL:DSPC de 2:5:40:53 y exhibieron una absorción que se puede resolver espectralmente. Tal como se muestra en la **Figura 36b**, los diodos láser (665 nm y 695 nm) proporcionaron un buen grado de separación de los dos colores de los liposomas de PoP.

A continuación, estos dos tipos de liposomas de PoP se cargaron con éxito con doxorubicina a través de un gradiente de sulfato y se sometió a irradiación con láser de un láser estándar de 665 nm (utilizado para todos los otros datos en esta propuesta) o un diodo láser de 695 nm. Tal como se muestra en la **Figura 36c**, el láser de 665 nm proporcionó un grado de permeabilización selectiva para los liposomas de PoP de pirofosfolípidos, mientras que el láser de 695 nm permeabilizó más eficazmente los liposomas de PoP purpurina-lípido. Aunque en ambos casos, finalmente se produjo la liberación para ambos tipos de liposomas, al detener la radiación láser después de solo un par de minutos se logra la liberación selectiva en este sistema.

**EJEMPLO 5**

Este ejemplo describe la liberación de la carga cargada pasivamente de liposomas de PoP estables en suero.

Se formaron liposomas de PoP con una relación molar de [50:5:2:32:11] [CHOL:PEG2K-DSPE:Piro-fosfolípido: DSPC: DOPC] y se hidrataron con 50 mM de sulforrodamina B, un colorante hidrófilo. Después de separar el colorante libre, los liposomas se sometieron a irradiación con láser. Tal como se muestra en la Figura 37, PoP confirió la liberación de la carga cargada pasivamente y se determinó que el 2% de PoP era óptimo. 38

**EJEMPLO 6**

Este ejemplo describe la liberación de irinotecan cargado activamente de liposomas de PoP.

Usando una formulación de liposomas similar a Doxil y la sustitución de parte del DSPC con pirofosfolípidos se pueden producir liposomas que podrían cargar Dox de forma estable y exhibir una farmacocinética similar a la de los liposomas libres de pirofosfolípidos. Sin embargo, existe una cantidad máxima de pirofosfolípido que podría añadirse a los liposomas antes de que la carga de Dox fuera imposible. Se encontró que esta cantidad era función del contenido de colesterol. Cuando el contenido de colesterol era del 35% en moles, la Dox solo podía cargarse en liposomas que contenían 2% en moles o menos de piro-fosfolípido. A un 45% en moles de colesterol, se pudo cargar Dox en liposomas que contenían un 8% en moles de piro-fosfolípido. Se sospechaba que esto se debía a la formación de cristales de Dox en los liposomas que provocaban que se estiraran y desestabilizaran la bicapa. No se encontró que esta tendencia estuviera presente cuando se cargaron liposomas que contenían pirofosfolípidos con IRT (irinotecán). Los liposomas se prepararon usando DSPC: DSPE-PEG2000: colesterol (relación molar 60: 5: 35) y se tituló el pirofosfolípido en sustitución de DSPC. Encontramos que mientras que Dox no podía cargarse en liposomas que contenían más de 2% en moles de piro-fosfolípido, IRT, sin embargo, no mostraba tal limitación y podía cargarse en liposomas que contenían hasta un 15% en moles de piro-fosfolípido. (**Figura 39A**). También se probó la liberación por luz de IRT de estos liposomas. Utilizando 2% en moles de piro, que anteriormente se encontró que era el óptimo para la liberación de Dox, se comparó la liberación de IRT con la liberación de Dox en suero al 50%. Los resultados mostraron que la liberación de IRT de los liposomas de PoP es más rápida que la de Dox (**Figura 39B**). Para ayudar a comprender estas diferencias entre IRT y Dox, se tomaron imágenes crio-TEM de liposomas cargados con IRT y Dox que comprenden DSPC: DSPE-PEG2000: Pirofosfolípido: Colesterol (relación molar 58: 5: 2: 35). Las imágenes mostraron que los liposomas cargados con IRT no formaban cristales grandes como Dox, ni tenían ningún efecto sobre la forma de los liposomas. En su lugar, el IRT formó cristales que ocuparon la totalidad del núcleo de los liposomas. (**Figura 40**). Esto demuestra que el IRT no altera la morfología de los liposomas, lo que sugiere que la carga deficiente de Dox en liposomas que contienen piro-fosfolípidos probablemente provoque la desestabilización de la bicapa debido al estiramiento inducido por la formación de cristales de Dox. Además, muestra que la liberación más rápida de IRT puede deberse a cristales más difundidos que pueden disolverse más fácilmente cuando se permeabiliza la bicapa de liposomas, que Dox que es un cristal más compacto.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Research Foundation for the State University of New York

<120> NANOSTRUCTURAS QUE COMPRENDEN CONJUGADOS DE PORFIRINA DE COBALTO-FOSFOLÍPIDO Y ETIQUETAS DE POLIHISTIDINA

<130> P49924-EP-PCT

<140> EP16780996.1

<141> 2016-04-18

<150> 62148292

<151> 2015-04-16

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido informador fluorescente

ES 2 865 392 T3

<400> 1

5 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Gly Ala Gly Ala Lys Gly His His His  
 1 5 10 15

His His His His  
 20

10

<210> 2  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido RGD

20 <400> 2

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys  
 1 5

25

<210> 3  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> péptido informador fluorescente

<400> 3

35 Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys Gly Ala Gly Ala Lys Gly  
 1 5 10

40 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Péptido etiquetado con his

<400> 4

50 Arg Gly Asp Tyr His His His His His His His  
 1 5 10

55 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 60 <223> péptido informador fluorescente

<400> 5

65 Lys Lys Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 6

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <223> péptido informador fluorescente  
 <400> 6  
 10 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His  
 1 5  
 <210> 7  
 15 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 20 <223> péptido informador fluorescente  
 <400> 7  
 25 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His  
 1 5 10  
 <210> 8  
 30 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> péptido informador fluorescente  
 <400> 8  
 40 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His His His  
 1 5 10  
 <210> 9  
 45 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> péptido informador fluorescente  
 <400> 9  
 55 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His His His His His His His His  
 1 5 10  
 <210> 10  
 60 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 65 <223> péptido informador fluorescente  
 <400> 10  
 70 Lys Lys Gly Gly Gly Gly His  
 1 5 10 15

ES 2 865 392 T3

5 <210> 11  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido MPER  
 10 <400> 11  
 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn  
 1 5 10 15  
 15 Gly Gly Lys Gly Gly His His His His His His His  
 20 25  
 20 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Péptido MPER  
 <400> 12  
 30 Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn  
 1 5 10 15  
 35 Gly Gly Lys  
 40 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido penetrador de células  
 45 <400> 13  
 His His His His His His His Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg  
 1 5 10 15  
 50 Arg Pro Pro Gln  
 20  
 55 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Péptido penetrador de células  
 <400> 14  
 65 His His His His His His His Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5 10 15

ES 2 865 392 T3

<210> 15  
<211> 23  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido penetrador de células  
  
10 <400> 15  
His His His His His His His Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn  
1 5 10 15  
  
15 Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
20  
  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Liposoma que comprende:
  - a) una bicapa, en la que la bicapa comprende:
    - i) fosfolípido, y
    - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando cobalto-porfirina, en la que la porfirina de cobalto se conjuga con un fosfolípido para formar un conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido; y
  - b) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la bicapa y una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas de forma no covalente con el cobalto en cobalto-porfirina, en la que la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa y, por tanto, se expone al exterior del liposoma, y en el que el liposoma encierra un compartimento acuoso.
2. Liposoma de la reivindicación 1, en el que el conjugado de porfirina de cobalto-fosfolípido constituye del 0,1 al 10 % en moles de la bicapa.
3. Liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la bicapa comprende además colesterol, fosfatidilserina o una combinación de los mismos.
4. Liposoma de la reivindicación 1, en el que la etiqueta de polihistidina comprende de 6 a 10 residuos de histidina.
5. Liposoma de la reivindicación 1, en el que el liposoma comprende una carga y en el que una parte de la carga reside en el compartimento acuoso.
6. Liposoma de la reivindicación 1, en el que la molécula de presentación es un péptido de 2 a 50 aminoácidos, sin incluir dicho número de aminoácidos las histidinas de la etiqueta de his.
7. Liposoma de cualquier reivindicación 1, en el que la molécula de presentación es una molécula antigénica.
8. Nanoestructura que comprende:
  - a) un núcleo de compartimento acuoso; y
  - b) una monocapa o una bicapa que encierra dicho núcleo, en la que la monocapa o bicapa comprende:
    - i) monómeros de fosfolípidos, y
    - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando porfirina de cobalto, en la que la porfirina se conjuga con los monómeros de fosfolípidos; y
  - c) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la monocapa o la bicapa, una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas al cobalto en la porfirina de cobalto, y la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa o la monocapa y, por tanto, se expone al exterior de la nanoestructura.
9. Liposoma, según la reivindicación 5, para su uso en un procedimiento de administración dirigida de una carga que comprende:
  - a) administrar a un individuo una composición que comprende los liposomas de la reivindicación 5;
  - b) después de un periodo de tiempo adecuado permitir que los liposomas alcancen una ubicación deseada en el individuo, exponer los liposomas a radiación infrarroja cercana de una longitud de onda de 650 a 1000 nm para efectuar la liberación de la carga de los liposomas.
10. Liposoma para su uso de la reivindicación 9, en el que el individuo es un ser humano o un animal no humano.
11. Composición que comprende un liposoma según la reivindicación 1, en la que la composición es para uso en un procedimiento para generar una respuesta inmune en un individuo huésped que comprende administrar al individuo una composición que comprende los liposomas de la reivindicación 1, en la que la molécula de presentación comprende un epítipo inmunogénico.
12. Composición para su uso de la reivindicación 11, en la que la molécula de presentación es un péptido, polipéptido o proteína derivado de un microorganismo patógeno.
13. Composición para su uso de la reivindicación 12, en la que el individuo es un humano o animal no humano.
14. Composición para su uso de la reivindicación 11, que comprende además un adyuvante.
15. Composición para su uso de la reivindicación 14, en la que el adyuvante es monofosforil lípido A.
16. Nanoestructura que comprende:
  - a) una nanopartícula de oro; y
  - b) un recubrimiento monocapa o bicapa sobre la nanopartícula de oro, en la que la monocapa o la bicapa comprende:

- i) monómeros de fosfolípidos, y
  - ii) porfirina que tiene cobalto coordinado a la misma formando porfirina de cobalto, en la que la porfirina está coordinada a los monómeros de fosfolípidos; y
  - c) una molécula de presentación etiquetada con polihistidina, en la que al menos una parte de la etiqueta de polihistidina reside en la parte hidrófoba de la monocapa o la bicapa, una o más histidinas de la etiqueta de polihistidina están coordinadas al cobalto en la porfirina de cobalto, y la molécula de presentación etiquetada con polihistidina se presenta en la superficie de la bicapa o la monocapa y, por tanto, se expone al exterior de la nanoestructura.
- 5

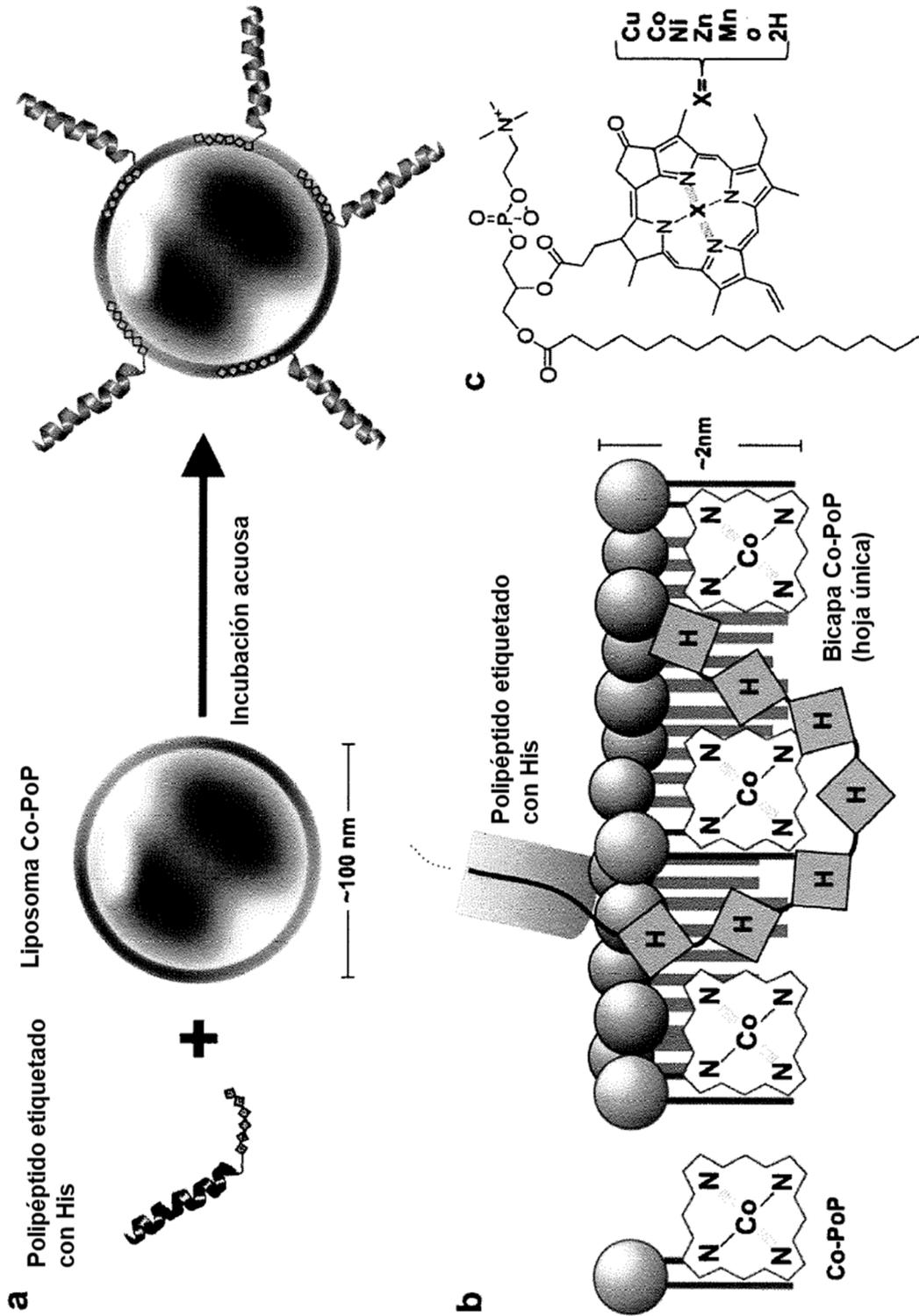
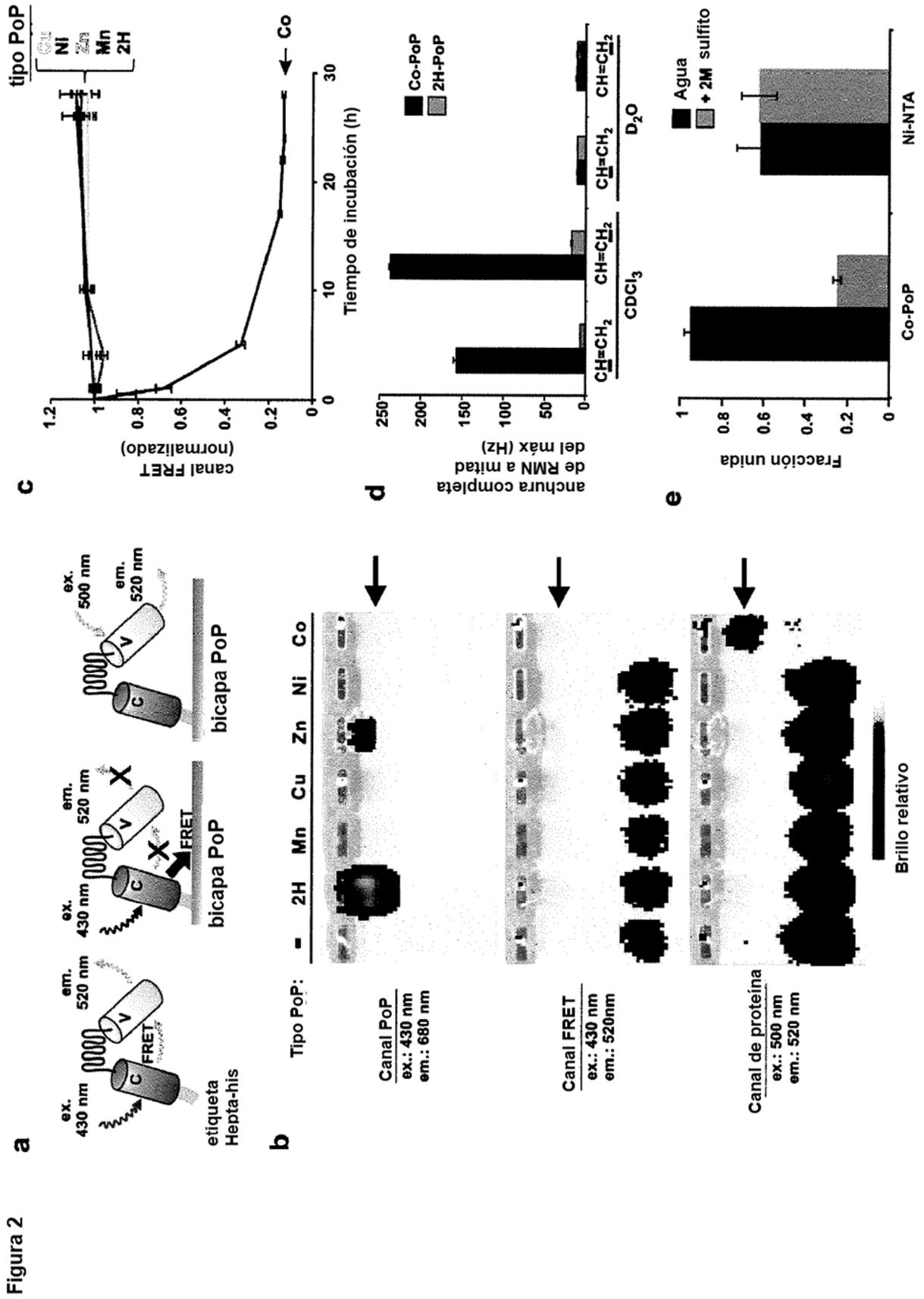


Figura 1



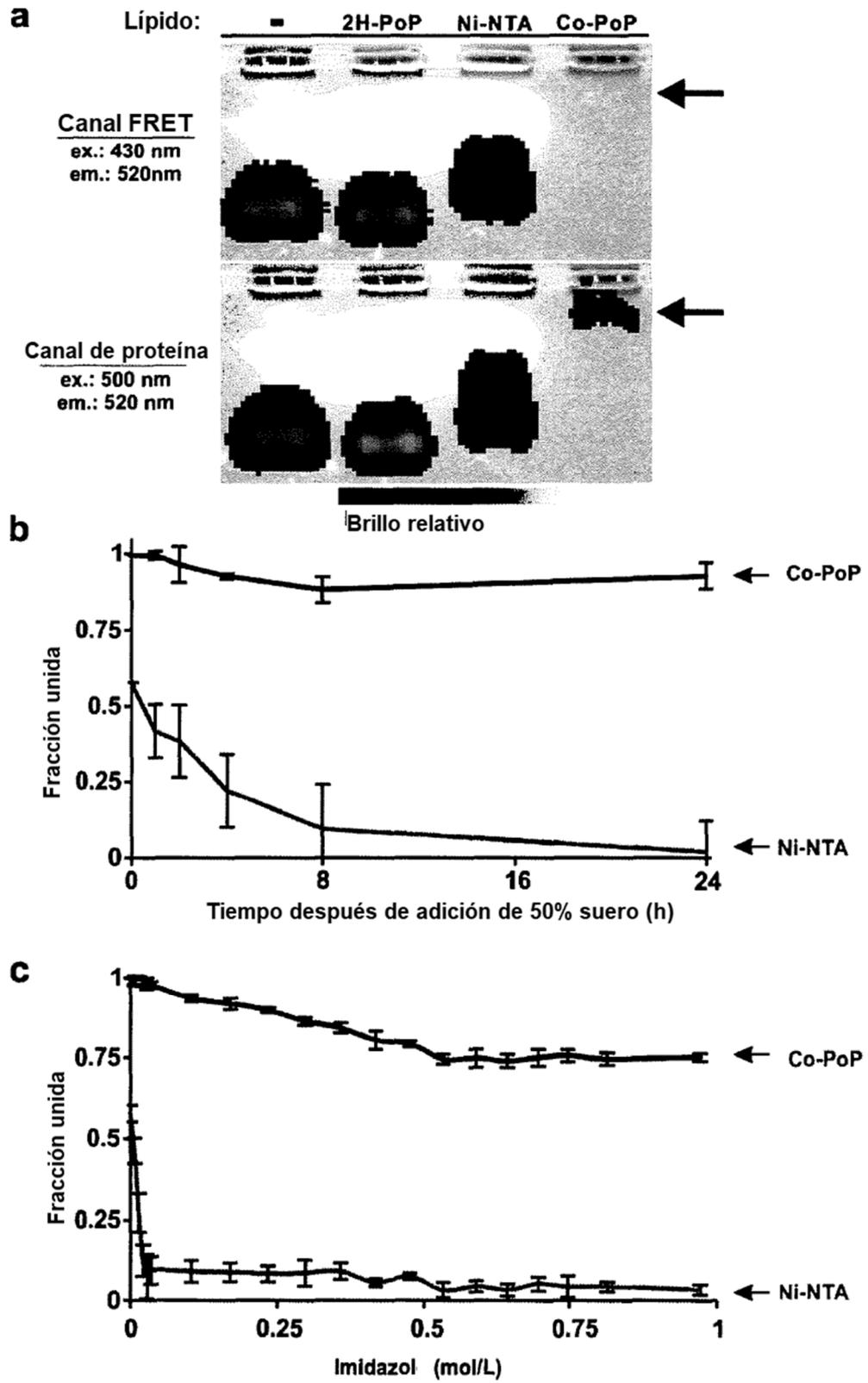


Figura 3

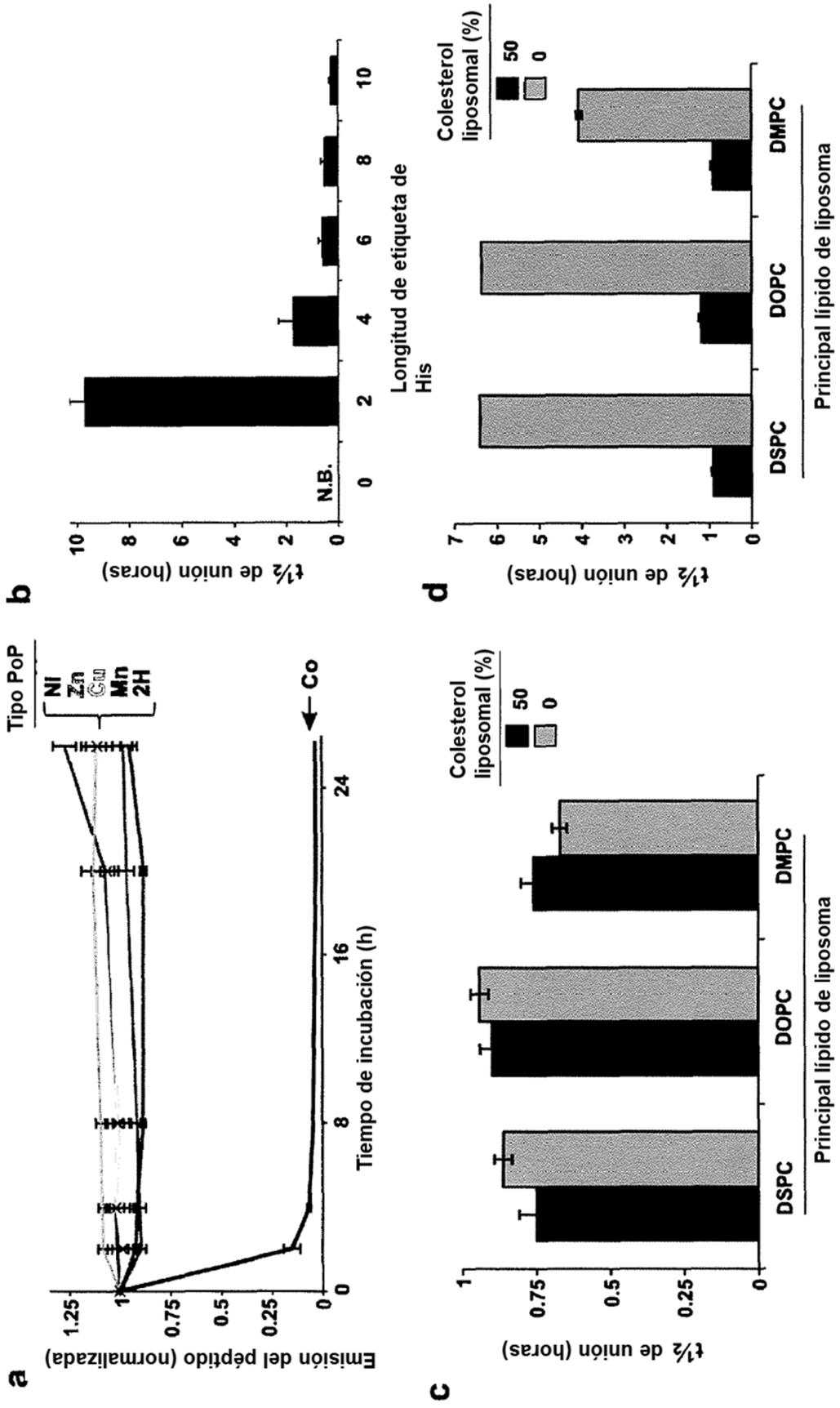
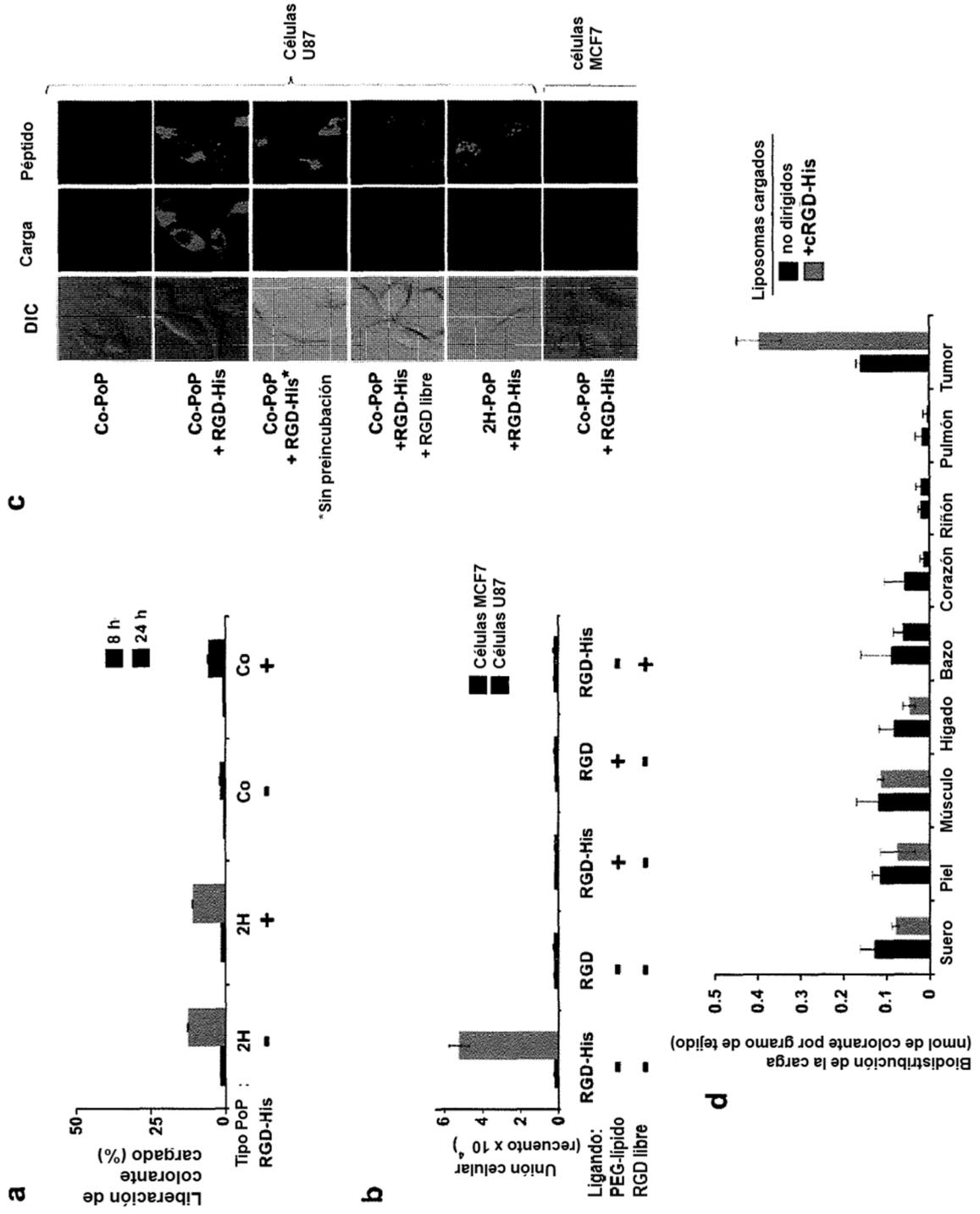


Figura 4

Figura 5





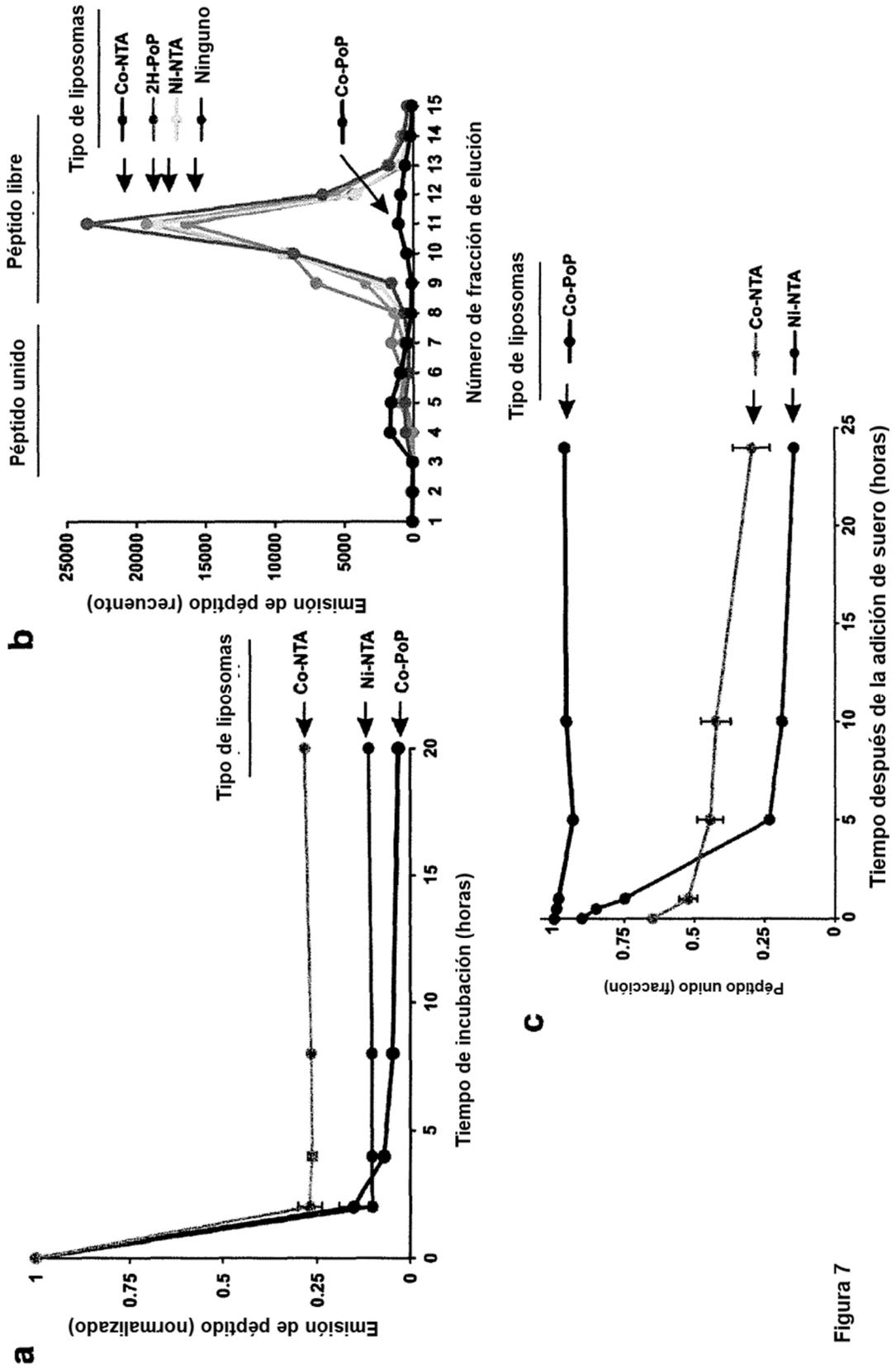


Figura 7

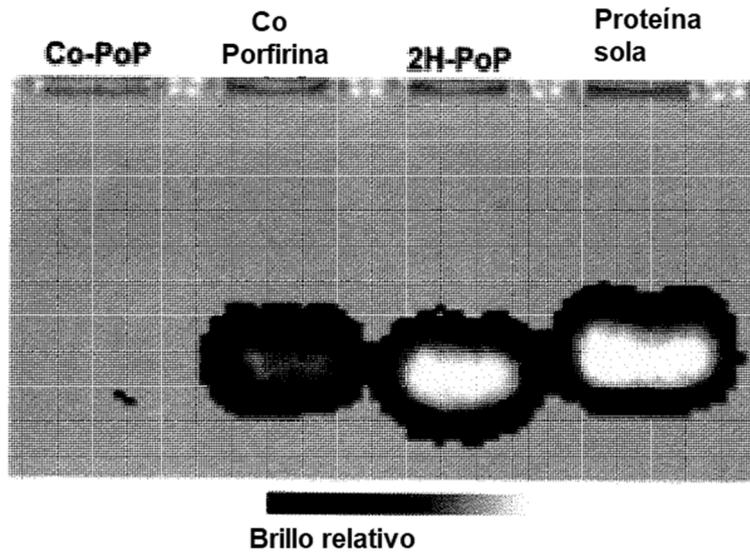


Figura 8

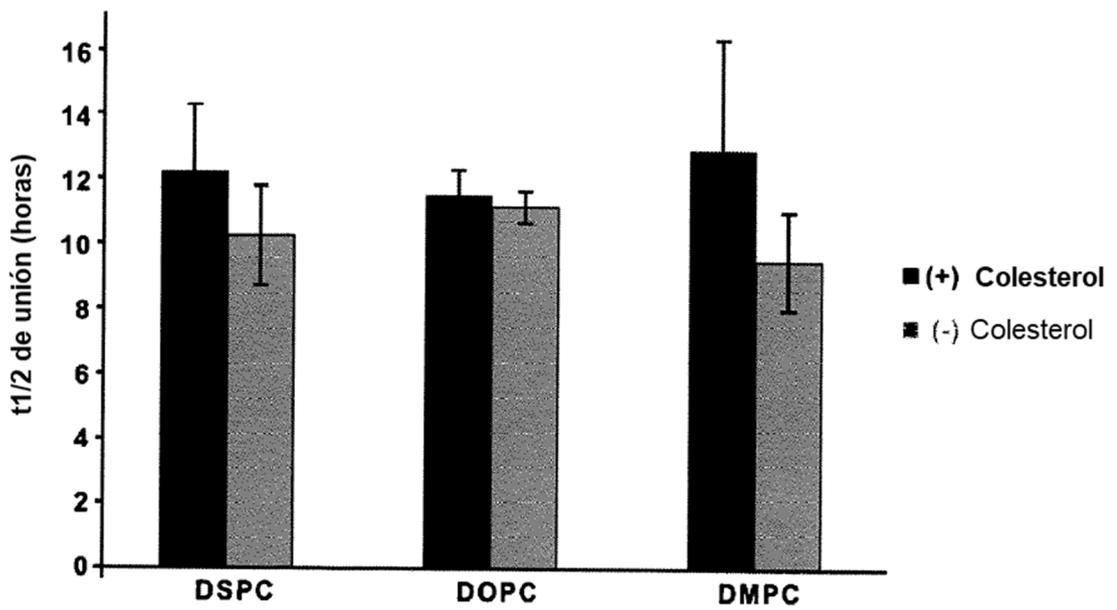


Figura 9

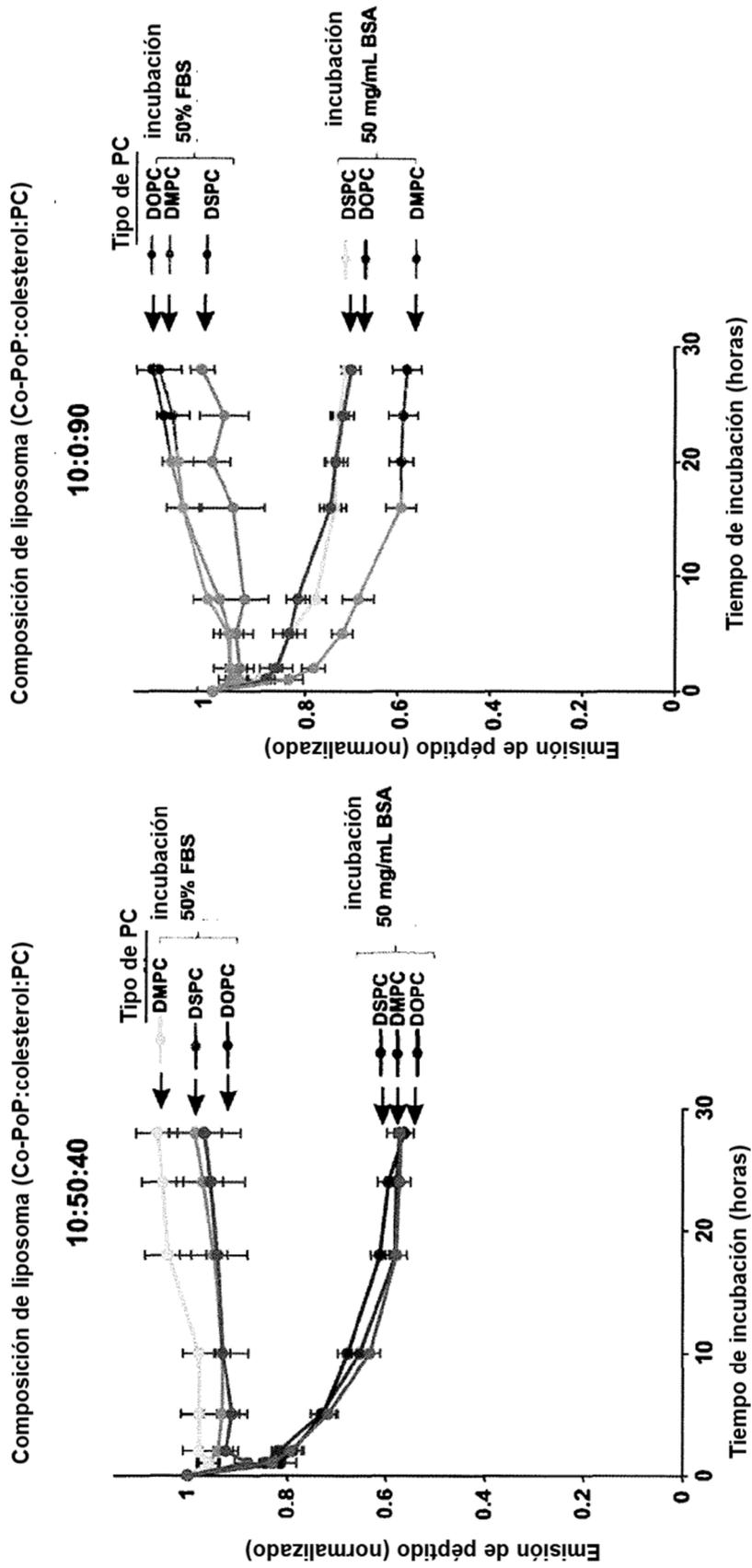


Figura 10

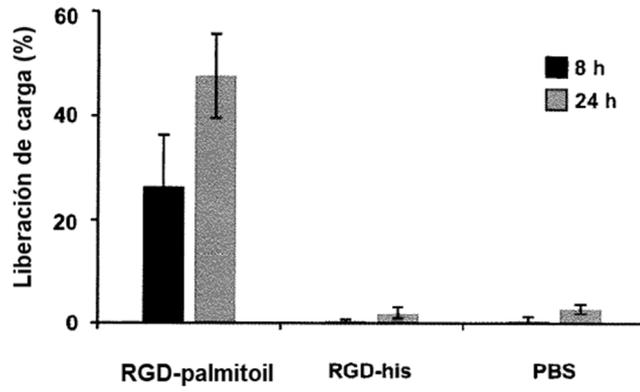


Figura 11

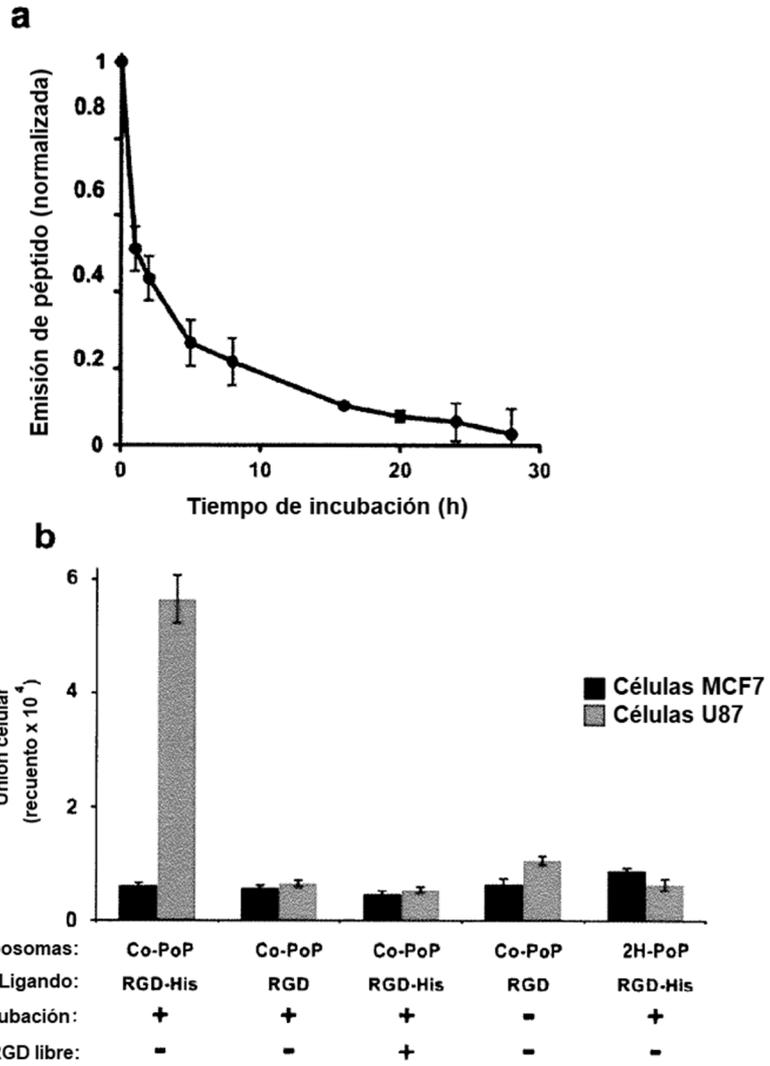


Figura 12

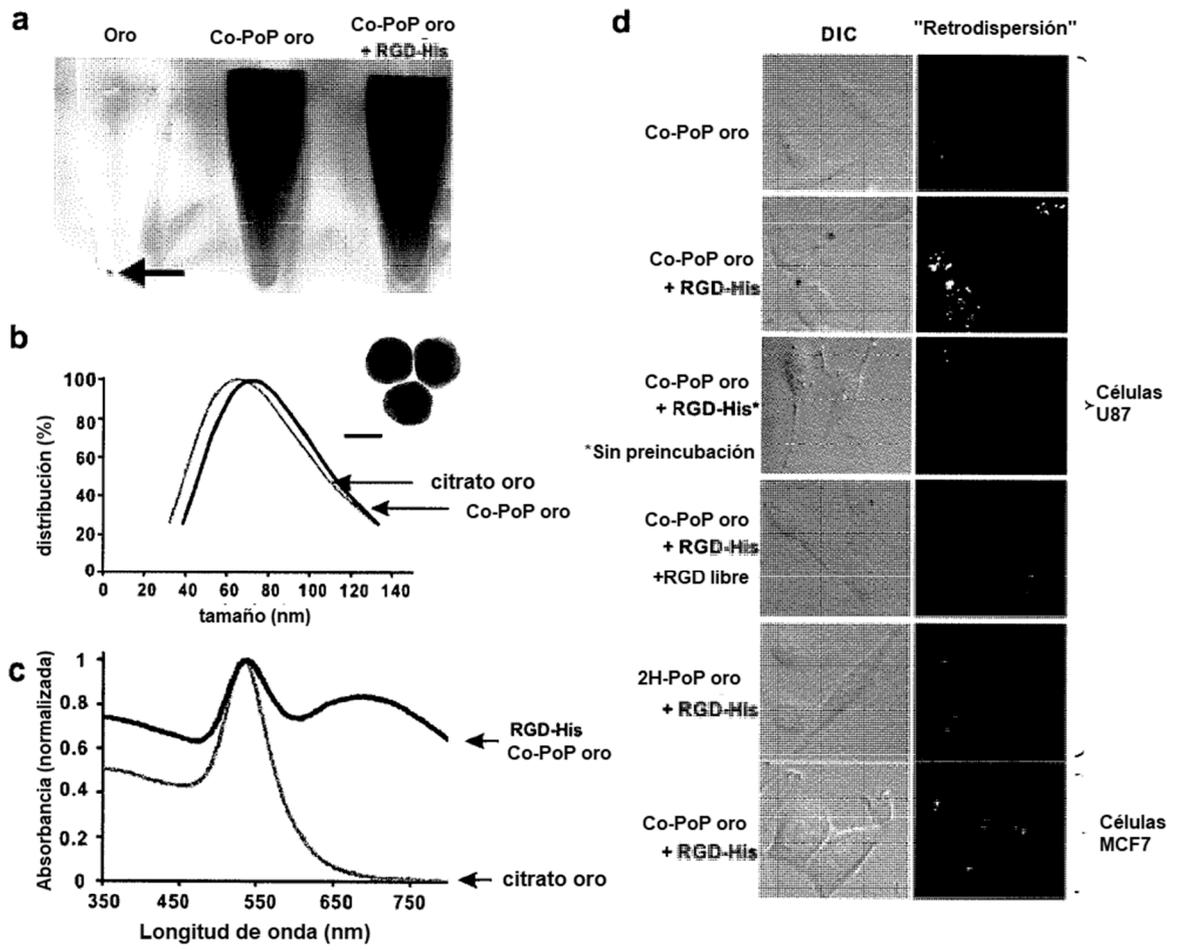


Figura 13

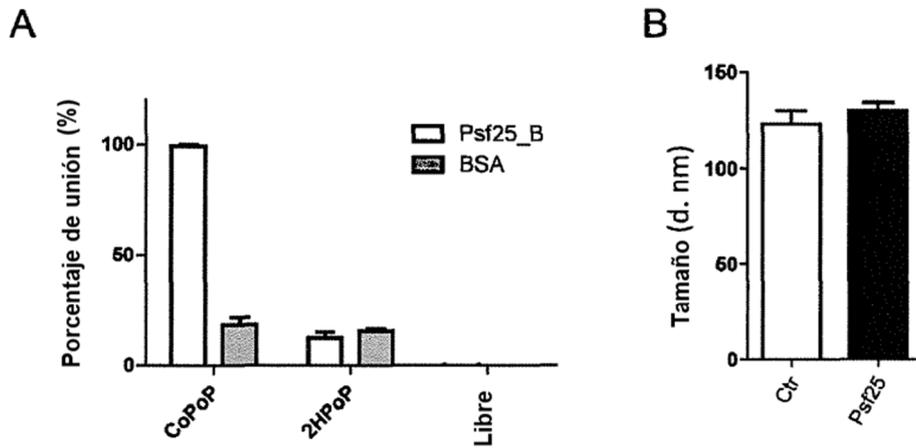


Figura 14

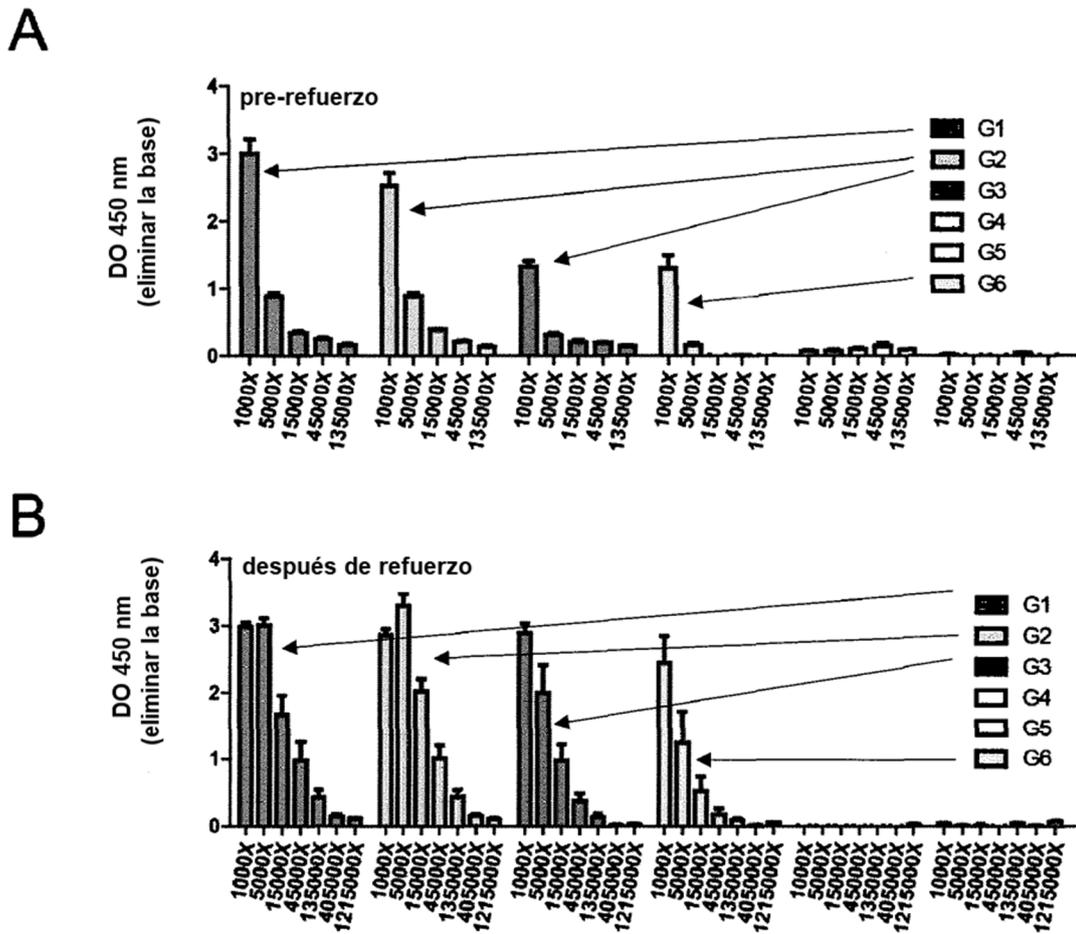


Figura 15

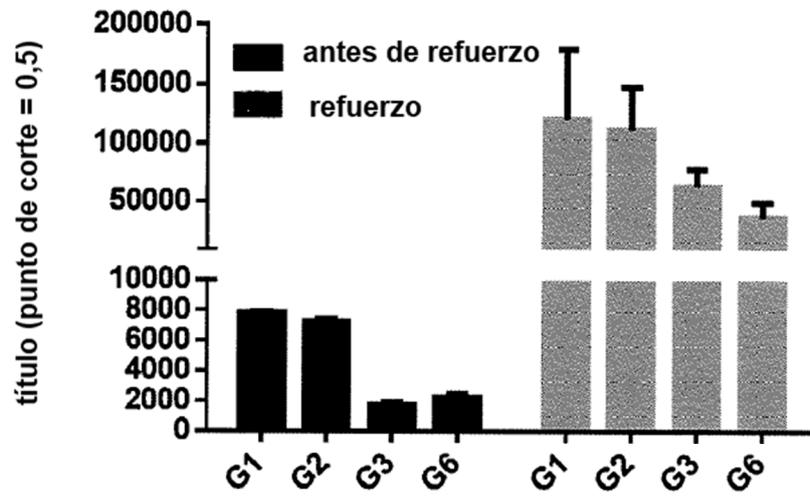
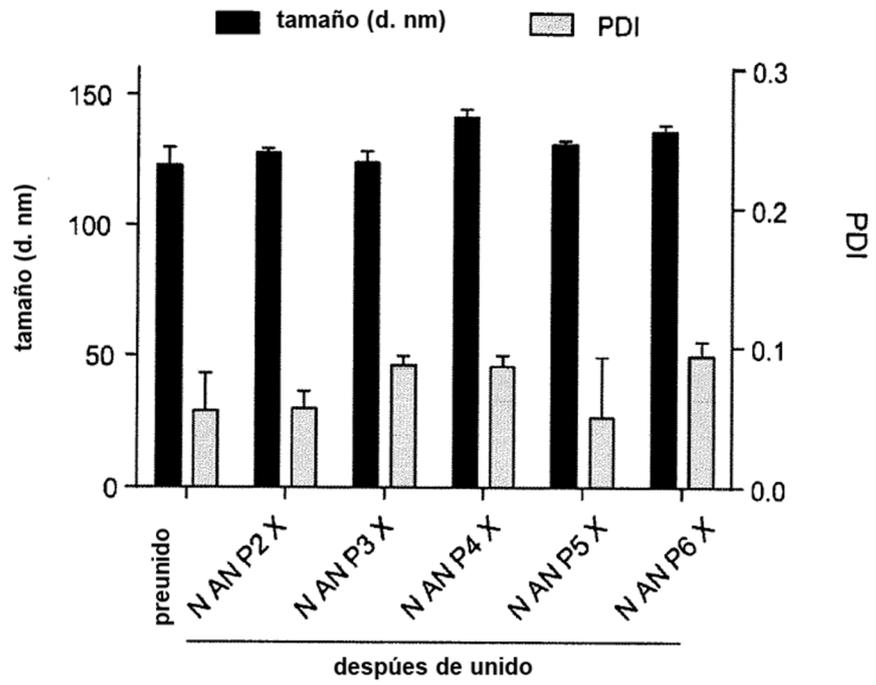


Figura 16



B



C

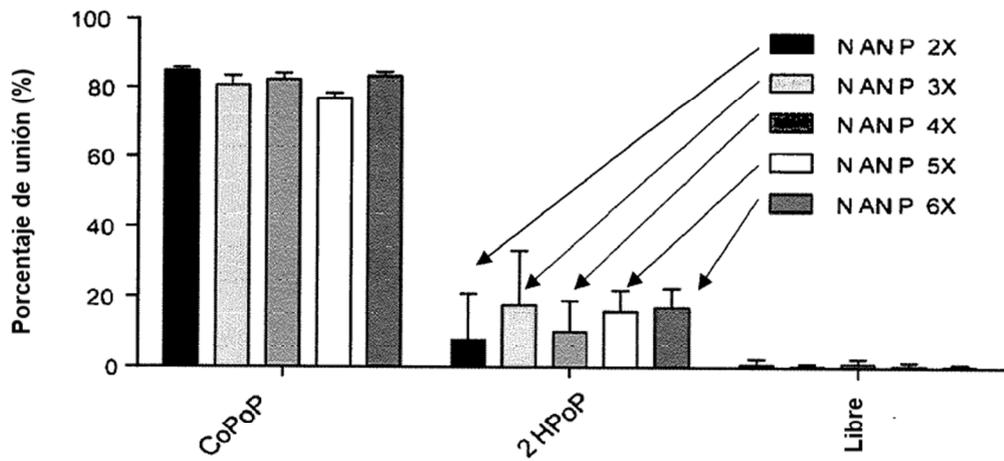


Figura 17 (continuación)

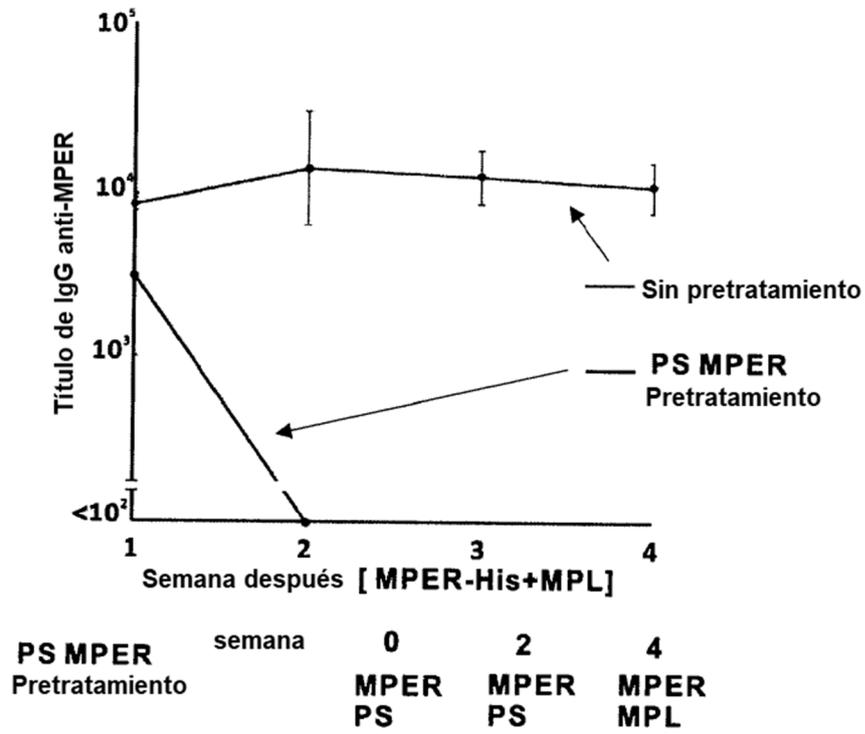


Figura 18

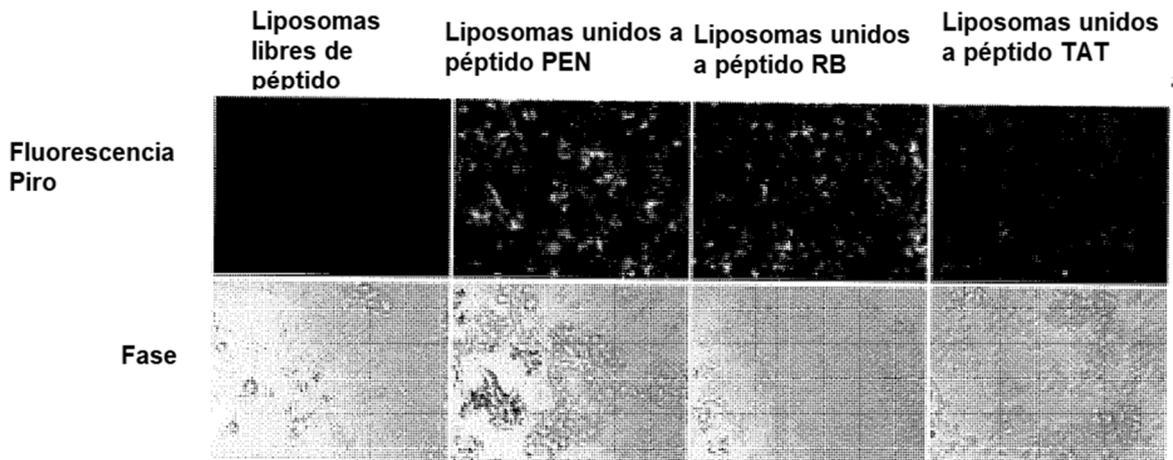


Figura 19