

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 623**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 47/44 (2007.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2019** **PCT/EP2019/050979**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2019** **WO19138139**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2019** **E 19700424 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022** **EP 3740196**

54 Título: **Nanosistemas como vehículos selectivos para fármacos**

30 Prioridad:

15.01.2018 EP 18382012

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2022

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
(FIDIS) (50.0%)**
Travesa da Choupana, s/n
15706 Santiago de Compostela, A Coruña, ES y
SERVIZO GALEGO DE SAUDE (50.0%)

72 Inventor/es:

DE LA FUENTE FREIRE, MARÍA;
LÓPEZ LÓPEZ, RAFAEL;
LÓPEZ BOUZO, BELÉN;
VÁZQUEZ RÍOS, ABI JUDIT y
ALONSO NOCELO, MARTA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 919 623 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

Nanosistemas como vehículos selectivos para fármacos

5 **Campo de la técnica**

La presente invención pertenece al campo médico, en particular al campo de vehículos farmacológicos con potencial nanoteranóstico, en particular para el enfoque contra el cáncer y el tratamiento de tumores primarios y enfermedad metastásica, la encapsulación de fármacos antineoplásicos y/o, finalmente, para la incorporación de un agente de contraste para su uso en diagnóstico *in vivo*.

Antecedentes de la invención

La presente invención ofrece una nueva herramienta farmacológica con potencial nanoteranóstico.

La nanotecnología es un sistema que puede combinar elementos de terapia e imagen en la misma nanoestructura que ofrece una serie de ventajas, entre las cuales, la posibilidad de monitorizar el tratamiento en tiempo real y, por tanto, poder ajustar el tipo y la dosificación de fármaco para cada paciente, además de facilitar el estudio de la biodistribución y acumulación del fármaco usando técnicas de obtención de imágenes no invasivas tales como tomografía por emisión de positrones (TEP) u obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). Mientras que la TEP requiere un elemento radiactivo, la IRM usa un imán capaz de generar un campo magnético constante de gran intensidad. Por tanto, esta técnica se aplica a partículas magnéticas tales como, por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION), cuya función en la obtención de imágenes por IRM es proporcionar un contraste negativo (oscuro), u otras moléculas tales como gadolinio o perfluorocarbonos.

En resumen, usando sistemas nanométricos asociados con agentes de contraste, ligandos adecuados y/o el fármaco indicado, se pretende llegar a un diagnóstico, lo más temprano posible, y un tratamiento con éxito a través de una unidad única, el nanoteranóstico.

En cuanto al tratamiento a través de dicha unidad única, el nanoteranóstico, este tipo de estructuras puede ser especialmente útil en el tratamiento de tumores. En este sentido, cabe señalar que, aunque los tumores primarios son los desencadenantes de diferentes tipos de cáncer, son los acontecimientos posteriores de la diseminación del tumor y la formación de metástasis los que determinan principalmente la morbilidad de los pacientes, siendo la causa del 90% de muertes por cáncer humano. Las metástasis se originan una vez que las células cancerosas se han separado del tumor original (primario), han viajado a través de la sangre o del sistema linfático, colonizando un órgano nuevo y provocando nuevos tumores en otros órganos o tejidos del cuerpo. Las células tumorales metastásicas presentan un fenotipo generalmente diferente al de las células del tumor primario, que generalmente son más resistentes, que junto con la ubicación distal hace que su monitorización y tratamiento sean especialmente complicados. Una posible solución es identificar y eliminar este tipo de células, antes de que proliferen de manera incontrolada. Para ello, se propone la posibilidad de funcionalizar nanopartículas, haciendo que sean muy selectivas y específicas contra las células tumorales, en particular células que han diseminado.

La presente invención aborda este aspecto proporcionando un sistema nanoteranóstico que debidamente funcionalizado puede facilitar la detección temprana y la erradicación no sólo de células del tumor primario sino también de células diseminadas, proporcionando una terapia eficaz contra el cáncer. Este sistema también permitirá, después de la asociación de un agente de contraste, un ligando y/o fármacos específicos, llegar a un diagnóstico, lo más temprano posible, y/o un tratamiento con éxito a través de una unidad única.

Breve descripción de la invención

En la presente invención, se describe en el presente documento el desarrollo de diversas nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) que contienen una fase oleaginoso o un núcleo oleaginoso, preferiblemente seleccionado de vitamina E o ácido oleico, estabilizadas por un esfingolípido del tipo esfingomielina, y opcionalmente otros lípidos tales como fosfolípidos, colesterol, octadecilamina, DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio) y derivados pegilados (derivados con polietilenglicol), para su uso como vehículo nanotecnológico, en particular para el tratamiento de cáncer y enfermedad metastásica. Dichas nanoemulsiones pueden funcionalizarse con ligandos capaces de interaccionar con o unirse a receptores expresados sobre la membrana celular de células tumorales y, en particular, capaces de interaccionar con o unirse a receptores expresados sobre la membrana de células tumorales primarias y/o diseminadas o metastásicas. Además, pueden encapsularse fármacos antineoplásicos o biomoléculas terapéuticas en dichas nanoemulsiones y, finalmente, pueden incorporarse agentes de contraste para su uso en el diagnóstico *in vivo* en dichas nanoemulsiones.

Además, los autores de la presente invención han identificado, en CTC (células tumorales circulantes) y en tumores, varios receptores de interés para el direccionamiento selectivo de nanoestructuras, tales como, por ejemplo, el receptor de leptina, el receptor de guanilil ciclasa u otras moléculas del tumor, o del microentorno tumoral, tales como integrinas y laminina, contra los que es posible dirigir estas nanoemulsiones, previa funcionalización con ligandos capaces de

mediar en una interacción selectiva, habiendo demostrado que, una vez que se han funcionalizado las nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) de la presente invención, que contienen una fase oleaginoso, preferiblemente seleccionada de vitamina E o ácido oleico, un esfingolípido del tipo esfingomielina y opcionalmente otros lípidos tales como fosfolípidos, colesterol, octadecilamina, DOTAP y derivados pegilados, con ligandos para este receptor, se observa una acumulación intracelular de dichas nanoemulsiones de una manera más eficiente en células tumorales primarias, diseminadas y metastásicas, preferiblemente en células metastásicas que tienen estos receptores y/o estas moléculas. Este descubrimiento abre las puertas a la funcionalización de cualquier tipo de nanosistema con un compuesto del grupo seleccionado de la lista que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, péptidos o moléculas hidrófobas o hidrófilas de peso molecular pequeño, tales como Lactisol, así como conjugados ligando-fármaco o ligando-radioisótopo, capaces de unirse a estos receptores y/o a estas moléculas, para su uso como vehículos farmacológicos y/o productos para diagnóstico contra células tumorales, en particular contra CTC (células tumorales circulantes) y contra células tumorales primarias, diseminadas o metastásicas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes adquiridas mediante microscopía electrónica de transmisión de nanoemulsiones de esfingomielina (SM) y vitamina E (V), preparadas con una razón V:SM 1:0,1 (A), y una población de nanoemulsiones que también incorporan octadecilamina (OCT), V:SM:OCT 1:0,1:0,01 (B).

Figura 2. Estabilidad de nanoemulsiones basadas en esfingomielina (SM) y vitamina E (V), a una razón V:SM 1:0,1, en cuanto a tamaño de partícula (A) y carga superficial (B) durante 6 meses a temperatura ambiente y durante un año a 4°C. Estabilidad de esta misma formulación después de la incubación en medio de cultivo y medio de cultivo complementado con FBS (C) y en plasma humano (D).

Figura 3. Ensayo de viabilidad celular (MTT) de nanoemulsiones con diferentes composiciones VSM (vitamina E y esfingomielina 1:0,1), varios tiempos de incubación (4 h y 24 h) en células SW480 (A y B), ensayo MTT de nanoemulsiones de ácido oleico y esfingomielina sin ligando (OA:SM 1:0,1) y con Lactisol (OA:SM:Lact 1:0,1:0,1), después de 48 h de incubación en células SW620 (C y D). Estudio de la dosis tolerada basado en el peso de los ratones que recibieron varias inyecciones intravenosas de nanoemulsiones VSM (vitamina E y esfingomielina 1:0,1) y VSM con DOTAP (VDOTAP al 1%) a dos concentraciones (10 mg/ml y 20 mg/ml). No hay cambios en el peso que puedan indicar toxicidad aguda o cambios conductuales fisiológicos o aparentes durante el periodo de observación (E).

Figura 4. Nanoemulsiones de vitamina E y esfingomielina (V:SM 1:0,1) con rojo Nilo encapsulado, e incubadas con células tumorales de diferentes orígenes (colon, pulmón, próstata y páncreas), y observadas bajo el microscopio confocal (el canal de DAPI corresponde a los núcleos y el canal de rojo Nilo a las nanoemulsiones) (A). V:SM 1:0,1 y V:SM:DOTAP 1:0,1:0,1 con DiR encapsulado, incubadas con células tumorales de colon (HTC116), y observadas bajo un microscopio confocal (las nanoemulsiones pueden observarse como puntos blancos alrededor del núcleo celular) (B) y V:SM 1:0,1 con DiR encapsulado, e incubadas con células tumorales de endometrio (HEC1A) y de colon (SW480) previamente transformadas para expresar GFP, y observadas bajo el microscopio confocal (el canal de rojo Nilo corresponde a las nanoemulsiones y el de GFP a los citoplasmas celulares) (C).

Figura 5. Nanoemulsiones de esfingomielina (V:SM 1:0,1) que encapsulan ARN fluorescente (Cy5-ARN), incubadas con células tumorales de colon previamente transformadas para expresar GFP (HCT116-GFP), y observadas bajo el microscopio confocal (el canal de GFP corresponde a las células y el de Cy5 se atribuye al ARN transportado por las nanoemulsiones) (A). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células SW620 tratadas con nanoemulsiones de ácido oleico y esfingomielina funcionalizadas con Lactisol (O:SM:Lact 1:0,1:0,1), que encapsulan nanopartículas magnéticas, observándose una señal de contraste correspondiente en las vacuolas que se han originado a nivel del citoplasma celular (imagen de la derecha, las flechas indican la ubicación), que no se observa en células control (no tratadas, imagen de la izquierda) (B).

Figura 6. Internalización de nanoemulsiones fluorescente evaluada mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia de células tumorales de colon (SW620), positivas para rojo Nilo encapsulado en nanoemulsiones de ácido oleico y esfingomielina, es mayor en cuanto a nanoemulsiones funcionalizadas con LAPI (OSM-LAPI; O:SM:LAPI 1:0,1:0,01, línea clara), con respecto a las nanoemulsiones no funcionalizadas (OSM, O:SM 1:0,1, línea oscura) (A). Representación en gráficos de barras de la intensidad de fluorescencia promedio obtenida en el citómetro (B).

Figura 7. Imágenes de microscopía confocal de células tumorales de colon (SW620) tratadas con nanoemulsiones de ácido oleico y un derivado de esfingomielina marcada con NBD, que también encapsulan DiR (OLM; O:SM 1:0,1), y las mismas nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol (OLM-L; O:SM:Lact 1:0,1:0,1). Los núcleos celulares se tiñen con Hoechst. Se observa una mayor intensidad de la señal (correspondiente a la esfingomielina marcada con NBD y al DiD encapsulado) en el caso de nanoemulsiones funcionalizadas.

Figura 8. Imágenes de microscopía confocal de células tumorales de colon (SW480 y SW620) tratadas con nanoemulsiones de vitamina E, esfingomielina y octadecilamina (V:SM:OCT 1:0,1:0,01) funcionalizadas con RPM (VSMSTRPM) y formulaciones de control no funcionalizadas (VSMSTSH), en las que se ha asociado miARN marcado

con fluoróforo Cy5. Se observa una mayor intensidad de fluorescencia debido a la internalización del miARN para las formulaciones funcionalizadas (VSMSTRPMmiARN), en ambas líneas celulares (el canal de Hoechst corresponde a los núcleos celulares y el de Cy5 al miARN asociado con las nanoemulsiones).

Figura 9. Viabilidad celular (ensayo MTT) de células tumorales de colon (SW620) después de tratarse con nanoemulsiones de ácido oleico y esfingomielina (O:SM 1:0,1, NE) y nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol (O:SM 1:0,1, F-NE), en blanco o que encapsulan el fármaco antineoplásico etopósido, después de una incubación de 48 horas (A). Expresión de mCherry (puntos blancos brillantes) en células HTC116 transfectadas con ADNp-mCherry asociado con nanoemulsiones de esfingomielina, vitamina E y DOTAP (V:SM:DOTAP 1:0,1:0,1) (imagen de la izquierda) y en células SW620 transfectadas con ADNp-mCherry asociado con nanoemulsiones de esfingomielina, vitamina E y putrescina (V:SM:P 1:0,1:0,1) (imagen de la derecha), 24 horas tras la transfección (B). Expresión de P53TG1 LncRNA en células HCT116 transfectadas con pTG1 asociado con nanoemulsiones V:SM:DOTAP (V:SM:DOTAP-pTG1), normalizada con respecto a GAPDH ($2^{-\Delta\text{ddct}}$) (C). Expresión de luciferasa en células HTC116-LUC. Se observa silenciamiento en el caso de células transfectadas con Lipofectamine y ARNip anti-luciferasa (Lipo_GL3) y transfectadas con V:SM:DOTAP (VDOTAP_GL3), pero no con las secuencias de ARNip inespecíficas (No Esp) (D).

Figura 10. Estudio de biodistribución de nanoemulsiones de esfingomielina decoradas con uroguanilina (O:SM:UROG 1:0,1:0,01) y cargadas con DiR, en ratones que han desarrollado un tumor después de la inoculación de células de cáncer colorrectal SW620 en ambos flancos. 24 horas después de la inyección intravenosa, se sacrificaron los animales y se extirparon los órganos para su observación en un equipo de obtención de imágenes ópticas (IVIS) (A). Crecimiento tumoral en ratones implantados por vía subcutánea con células de cáncer colorrectal SW620. Se dividieron aleatoriamente los ratones en 2 grupos. GRUPO 1: animales de control, que no han recibido tratamiento (línea clara). GRUPO 2: animales tratados con etopósido encapsulado en nanoemulsiones de esfingomielina decoradas con uroguanilina (NE UROG, línea oscura), administrado por vía intravenosa (4 inyecciones los días 1, 4, 8 y 11, dosis: 0,2 mg de etopósido/kg) (B).

Figura 11. Internalización de nanoemulsiones de esfingomielina (O:SM 1:0,1) y funcionalizadas con Lactisol (O:SM:Lact 1:0,1:0,1), marcadas con DiR e incubadas durante 4 horas en células tumorales SW620 con expresión elevada de TAS1R3. La intensidad de fluorescencia es mayor que en el caso de nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol. Los núcleos celulares se tiñen con DAPI y la señal más clara se atribuye a DiD, encapsulado dentro de las nanoemulsiones.

Figura 12. Expresión de TAS1R3 en tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón metastásico (NSCLC), frente a tejido de control no tumoral (n=6) (A). Expresión relativa del receptor TAS1R3 (ARNm) en diferentes líneas celulares de diferentes tipos de tumores, colon (SW620 y SW480), pulmón (A549 y H1755), glioblastoma (U87 y U118) y páncreas (MiaPaCa2) (valor de $P = 0,0001$) (B). Estudio de la expresión de los diferentes receptores (GCC, LEPR, TAS1R3 y laminina-5) mediante inmunofluorescencia (señal clara) en un panel de células tumorales de diferente origen, cáncer colorrectal SW620, pulmón A549 y mama MCF7 (C).

Figura 13. Esta figura muestra la viabilidad/toxicidad celular de las nanoemulsiones de la invención. Muestra un ensayo comparativo en el que se comparan nanoemulsiones que comprenden vitamina E + esfingomielina (VSM) con nanoemulsiones que comprenden vitamina E + ceramida (VCer6). Tal como puede observarse en esta figura, la toxicidad de las nanoemulsiones que comprenden ceramida es significativamente mayor. V: vitamina E; SM: esfingomielina; Cer6: ceramida C6.

Figura 14. Esta figura muestra la viabilidad/toxicidad celular de las nanoemulsiones de la invención. Muestra que no todos los núcleos oleaginosos son igualmente adecuados para obtener nanoemulsiones terapéuticas no tóxicas. La combinación de esfingomielina con ácido linoleico (L) o con ácido oleico (O) demuestra que el uso de un núcleo oleaginoso tal como ácido linoleico (L) o ácido oleico (O) es altamente tóxico. Tal toxicidad se reduce significativamente cuando se usa vitamina E. V: vitamina E; SM: esfingomielina; O: ácido oleico; L: ácido linoleico.

Figura 15. Esta figura muestra la estabilidad de las nanoemulsiones de la invención. Muestra ensayos comparativos que muestran la estabilidad de diferentes nanoemulsiones. Particularmente, se comparó la estabilidad de las siguientes nanoemulsiones: Vitamina E + fosfatidilcolina (V:PC). Vitamina E + ceramida (V:Cer6). Triglicéridos + esfingomielina + colesterol (TOG:SM:CH). Vitamina E + esfingomielina (V:SM), en diferentes condiciones. Figura 15A (estabilidad a 4°C). Figura 15B (estabilidad a 37°C). Figura 15C (estabilidad en PBS 10 mM). Figura 15D (estabilidad en plasma). Tal como puede observarse en las figuras, la nanoemulsión que comprende esfingomielina es más estable tanto durante el almacenamiento como en medio salino y en plasma, en comparación con las nanoemulsiones que comprenden otros esfingolípidos tales como ceramida, o un fosfolípido tal como fosfatidilcolina. Vitamina E + fosfatidilcolina (VPC). Vitamina E + ceramida (VCer6). Triglicéridos + esfingomielina + colesterol (TOGSMCH). Vitamina E + esfingomielina (VSM).

Figura 16. Esta figura muestra la estabilidad de las nanoemulsiones de la invención. Muestra ensayos comparativos en cuanto a la estabilidad de diferentes nanoemulsiones que comprenden todas ellas esfingomielina y diferentes núcleos oleaginosos. Figura 16A (estabilidad en PBS 100 mM). Figura 16B (estabilidad en PBS 50 mM). Figura 16C

(estabilidad en PBS 10 mM). Curiosamente, la estabilidad de las nanoemulsiones que comprenden un núcleo de ácido linoleico u oleico disminuye claramente en comparación con la estabilidad mostrada cuando se usa vitamina E. V: vitamina E; SM: esfingomielina; O: ácido oleico; L: ácido linoleico.

- 5 Figura 17. Esta figura muestra la estabilidad de las nanoemulsiones de la invención. Muestra que, en condiciones de estrés a 40°C y una humedad del 75% (condiciones requeridas u obligatorias para la aprobación regulatoria), las nanoemulsiones que tienen un núcleo de ácido oleico (OSM) o un núcleo oleaginoso diferente (Miglyol) y tensioactivo (fosfatidilcolina) son claramente inestables, mientras que las nanoemulsiones que comprenden vitamina E y esfingomielina son estables. V: vitamina E; SM: esfingomielina; O: ácido oleico; PC: fosfatidilcolina; M: Miglyol.

10

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 15 En la presente invención, se entiende que “nanoemulsión” son estructuras compuestas por un aceite o mezclas de aceites, dispersos en agua como gotitas de tamaño nanométrico y, a su vez, estabilizados por medio de un copolímero o tensioactivo que impedirá la floculación o coalescencia de las gotas. Este tipo de nanoemulsiones viene determinado por su tamaño y distribución de gotitas, y al ser emulsiones nanométricas, son cinética pero no termodinámicamente estables, a diferencia de las microemulsiones. Por tanto, teniendo en cuenta el diámetro de gotita promedio, se entiende que nanoemulsión significa aquellas emulsiones que tienen un diámetro de gotita medio de entre 20 y 500 nm, teniendo las microemulsiones o macroemulsiones un diámetro de gotita promedio de entre 0,5 y 100 µm. Preferiblemente, basándose en el diámetro de gotita promedio, se entiende que nanoemulsión significa aquellas emulsiones que tienen un diámetro de gotita medio de menos de 300 nm.

- 25 En la presente invención, se entiende que “nanopartícula” es cualquier tipo de partícula, o grupo de partículas, o componentes que tienen un diámetro promedio comprendido entre 1 nm y 500 nm, así como los componentes o las partículas, o el grupo de partículas, que tienen un diámetro promedio comprendido entre 1 nm y 500 nm de la fase dispersa de una suspensión coloidal.

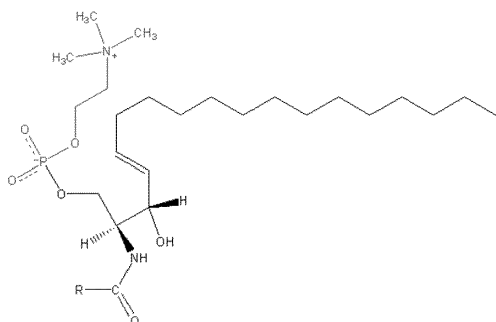
- 30 En la presente invención, se entiende que “composiciones nanoestructuradas” son combinaciones de materiales y/o conjugados que dan lugar a nanopartículas.

- En la presente invención, se entiende que “nanosistema” es cualquier tipo de nanopartícula, nanoemulsión, estructura coloidal (por ejemplo, liposoma, nanocápsula, etc.) y/o conjugado del tipo ligando-fármaco o ligando-radioisótopo, en el que, en suspensión acuosa, dicha nanopartícula o dicho diámetro de gotita medio de una nanoemulsión, o dicha estructura coloidal o conjugada del tipo ligando-fármaco o ligando-radioisótopo, tiene un diámetro promedio comprendido entre 1 nm y 500 nm, preferiblemente menos de 300 nm, y de manera óptima alrededor de 100 nm.

- 40 Por “diámetro promedio” se entiende el diámetro hidrodinámico de las partículas que difunden a la misma velocidad. Este tamaño de partícula promedio se calcula usando la técnica de difusión dinámica de luz (DLS), que mide el movimiento browniano de las nanopartículas y lo relaciona con su tamaño, basándose en el hecho de que las partículas más pequeñas difunden más rápido que las partículas grandes cuando el láser incide sobre las mismas.

- 45 En la presente invención, se entiende “funcionalización” como la unión por medio de interacciones químicas (por ejemplo, covalentes, electrostáticas, hidrófobas, etc.) de moléculas que proporcionan funcionalidad a los nanosistemas, ya sean fármacos para uso terapéutico, elementos de contraste para uso diagnóstico, ligandos para mediar en interacciones con moléculas/células diana, así como compuestos cargados, tensioactivos o disolventes para alterar sus propiedades fisicoquímicas (propiedades de tamaño, dispersión y superficie).

- 50 En la presente invención, se entiende que “esfingomielina” significa un lípido de la familia de esfingolípidos, siendo el más común, hallado en las membranas celulares, el único esfingolípido que es un fosfolípido, que tiene la siguiente estructura química:



55

En la presente invención, se entiende que “esfingolípido” significa lípidos con propiedades anfipáticas que fisiológicamente representan funciones biológicas importantes y desempeñan un papel importante en la formación de membranas biológicas, y generalmente se clasifican en fosfoesfingolípidos y glicosfingolípidos.

5 En la presente invención, se entiende “núcleo oleaginoso” como un aceite o mezclas de aceites, estabilizados por tensioactivos, preferiblemente por esfingolípidos, y que pueden abarcar también otros tipos de moléculas solubles en los mismos o en suspensión, tales como fármacos, fluoróforos, radioisótopos, agentes de contraste, etc.

10 En la presente invención, se entiende “ligando” como una molécula dispuesta hacia la superficie de los nanosistemas, para favorecer la interacción de la misma con moléculas diana, tales como receptores expresados a nivel de la membrana celular de células tumorales. Dependiendo de su naturaleza, pueden ser ácidos nucleicos, aptámeros, péptidos, proteínas, moléculas hidrófilas o hidrófobas de bajo peso molecular, así como derivados de los mismos, para generar moléculas anfífilas.

15 En la presente invención, se entiende “receptor TAS1R3” como un receptor transmembranario acoplado a la proteína G del gusto, que se expresa en los botones gustativos, pero también en otros tejidos tales como hígado y páncreas, y en células tumorales. Existen múltiples referencias a este receptor, tales como HGNC: 15661; Entrez Gene: 83756; Ensembl: ENSG00000169962; OMIM: 605865; o UniProtKB: Q7RTX0.

20 En la presente invención, se entiende que un ligando para el receptor TAS1R3 son moléculas capaces de interaccionar con el receptor TAS1R3, tales como monosacáridos y disacáridos, edulcorantes artificiales tales como sucralosa, ciclamato, neohesperidina, dihidrochalcona, inhibidores del dulzor tales como Lactisol, proteínas tales como brazzeína, y otros específicamente diseñados por medio de sistemas de selección tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, aptámeros, moléculas pequeñas, proteínas, etc.

25 En la presente invención, “conjugados con ligandos” significa conjugados químicos que incorporan un lisado y una molécula con actividad terapéutica (fármaco, radiofármaco, etc.) o con propósitos de diagnóstico (radioisótopo, quelante, gadolinio, etc.).

30 En la presente invención, la “razón (p/p) aceite/esfingolípido” está entre 0,005 y 1:10, que significa razón en masa, en la que la cantidad de aceite se establece en 1, y la proporción de esfingolípido se determina en relación con esa unidad.

Descripción

35 En la presente invención, se ilustra el desarrollo de formulaciones para su uso como vehículo nanotecnológico, en particular para el tratamiento y/o la monitorización de enfermedad tumoral localizada y/o metastásica. Dichas formulaciones pueden funcionalizarse con ligandos capaces de interaccionar con o unirse a receptores expresados sobre la membrana celular de células tumorales y, en particular, capaces de interaccionar con o unirse a receptores expresados sobre la membrana de células tumorales primarias, diseminadas o metastásicas. Además, pueden encapsularse fármacos antineoplásicos o biomoléculas terapéuticas en dichas nanoemulsiones y, finalmente, pueden incorporarse agentes de contraste para su uso en el diagnóstico *in vivo* en dichas nanoemulsiones.

45 Para este propósito se han desarrollado, usando el procedimiento mostrado en los ejemplos de la presente invención, diversas nanoemulsiones del tipo aceite en agua (cuya caracterización se detalla en el primer aspecto de la presente invención) que contienen una fase oleaginoso o un núcleo oleaginoso, preferiblemente seleccionado de vitamina E o ácido oleico, estabilizado por un esfingolípido del tipo esfingomielina, y opcionalmente dicha nanoemulsión puede contener otros lípidos tales como fosfolípidos, colesterol, octadecilamina, DOTAP y derivados pegilados, así como conjugados de poliaminas con cadenas lipídicas. A modo de ejemplo, se muestran las propiedades fisicoquímicas de dichas nanoemulsiones preparadas basadas en dichos compuestos (tabla 1).

Tabla 1. Caracterización de nanoemulsiones de esfingolípidos con diferentes composiciones.

COMPOSICIÓN	Razón (masa)	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial ζ (mV)
V:SM	1:0,005	135±1	0,1	-4±6
V:SM	1:0,01	147±8	0,1	-8±7
V:SM	1:0,1	108±2	0,1	-9±6
V:SM	1:1	118±8	0,2	-6±1
V:SM	1:10	201±86	0,3	-9±1
V:SM:DOTAP	1:0,1:0,1	122±2	0,1	+50±2
V:SM:OCT	1:0,1:0,01	95±1	0,2	+58±1
V:SM:CH-DC	1:0,1:0,01	68±1	0,3	+40±6

V:SM:P	1:0,1:0,1	92±31	0,3	+43±7
O:SM	1:0,1	138±1	0,1	-34±1
O:SM	1:0,2	133±2	0,2	-35±1
O:SM	1:10	123±16	0,2	-28±5
O:SM:PC	1:0,1:0,1	145±4	0,2	-35±1
O:SM	1:0,1	86±1	0,2	-30±3
L:SM	1:0,1	184±5	0,2	-27±1
L:SM	1:0,2	169±12	0,2	-25±1
L:SM	1:0,5	171±30	0,2	-32±6
M:SM	1:0,2	55±2	0,1	-23±4
V:Cer	1:0,1	223±4	0,2	-38±5
O:Cer	1:0,1	255±7	0,2	-36±1

SM: esfingomielina; V: vitamina E; DOTAP: lípido catiónico; PC: fosfatidilcolina; OCT: octadecilamina; P: derivado de putrescina con una cadena de ácido oleico; CH-DC: derivado catiónico del colesterol; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; M: Miglyol; Cer: ceramida

5 PDI: índice de polidispersidad

ζ: potencial zeta

10 Además, se ha procedido a analizar este tipo de nanoemulsiones mediante microscopía electrónica de transmisión, para determinar su morfología y distribución de tamaños. En la figura 1, es posible observar poblaciones de nanopartículas redondas con una distribución homogénea. Cabe señalar también que las nanoemulsiones desarrolladas son altamente estables, en cuanto a sus propiedades coloidales, tanto durante el almacenamiento como en presencia de líquidos biológicos, tal como se muestra en la figura 2.

15 Por otro lado, con el fin de determinar el valor nanoteranóstico de las nanoemulsiones de la presente invención, se funcionalizaron con moléculas capaces de potenciar su interacción con o unión a células tumorales que expresan determinados receptores de interés tales como TAS1R3, guanilil ciclasa C, el receptor de leptina o moléculas tales como integrinas y laminina. Estos estudios fueron acompañados por la identificación de estos receptores/moléculas diana en células tumorales metastásicas. Con el fin de llevar a cabo dicha funcionalización, se adquirieron los ligandos descritos en la tabla 2 y se unieron mediante unión covalente a un residuo hidrófobo (por ejemplo, C16, C18, etc.), con o sin un espaciador (PEG). En otros casos (UROGLys, BRA, INT y LEPT), se realizaron incubaciones en nanoemulsiones preformadas. A continuación se describen las secuencias de los péptidos usados (tabla 2) y las propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones resultantes (tabla 3).

25 Tabla 2. Descripción de los ligandos usados en los estudios de funcionalización de nanoemulsiones.

LIGANDO	DESCRIPCIÓN
LAPI	C18-PEG8-LDFIK
UROG	C18-PEG12-NDDCELCVNVACTGCL Con puentes disulfuro entre C4-C12 y C7-C15
UROGLys	KKKKKKNDDC(4)ELC(7)VNVAC(12)TGC(15)L Con puentes disulfuro entre C4-C12 y C7-C15
LACT	Lactisol (N.º CAS 150436-68-3)-C16 / Lactisol-C18
BRA	CFYDEKR
LEPT	Leptina humana recombinante
INT	Integrina humana α6 (Phe24-Lys878). PM=104 KDa Integrina humana β4 (Asn28-Ser710). PM=84,8 KDa
RPM	C18-PEG8-CPIEDRPMC

Tabla 3. Composición y propiedades fisicoquímicas de nanoemulsiones funcionalizadas con varios ligandos de interés.

LIGANDO	COMPOSICIÓN	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial ζ (mV)
LAPI	V:SM:LAPI1:0,1:0,01	129±3	0,1	+4±1

UROG	O:SM:UROG 1:0,2:0,01	135±4	0,1	-24±5
UROGLys	O:SM:UROGLys 1:0,2:0,01	148±20	0,2	-34±4
LACT	O:SM:LACT1:0,1:0,1	139±8	0,2	-59±4
BRA	O:SM:PC:BRA1:0,1:0,1:0,005	161±4	0,2	-33±2
INT	V:SM:INT1:0,1:0,01	118±1	0,1	-10±1
LEPT	V:SM:LEPT1:0,1:0,01	242±9	0,2	-8±1
RPM	V:SM:RPM1:0,1:0,05	126±0,4	0,1	-28±1

SM: esfingomielina; V: vitamina E; O: ácido oleico; OCT: octadecilamina; LAPI: péptido de leptina; UROG: uroguanilina, UROGLys: uroguanilina cationizada con lisinas; Lact: Lactisol; BRA: péptido de brazzeína; LEP: leptina; INT: fracción extracelular de una integrina; RPM: péptido contra una integrina.

PDI: índice de polidispersidad

ζ: potencial zeta

Cabe señalar que dichas funcionalizaciones se llevaron a cabo tal como se describe en el ejemplo 3. Para este fin, se optimizaron nanoemulsiones con diferente densidad de ligandos y, en todos los casos, se determinó su estabilidad coloidal durante el almacenamiento y en presencia de medios biológicos. Además, es importante mencionar que la funcionalización de los nanosistemas descritos a lo largo de este informe que contienen esfingomielina con moléculas de bajo peso molecular, tal como sería el caso de Lactisol, es muy interesante puesto que es un ligando fácil de producir y aumentar de escala, y muy económico en relación con ligandos convencionales tales como anticuerpos, péptidos y proteínas. Este tipo de formulaciones también presenta un elevado interés porque se dirigen al receptor TAS1R3, lo que tiene una serie de ventajas que se describen a lo largo de la memoria descriptiva de la patente.

Habiendo observado la posibilidad de funcionalizar los nanosistemas de la invención, se asociaron varios tipos de moléculas con actividad terapéutica con las nanoemulsiones de la invención, tanto para determinar sus propiedades fisicoquímicas como su posible actividad. Se muestran algunos ejemplos de nanoemulsiones cargadas con estas moléculas, y su caracterización, en la siguiente tabla (tabla 4). Dichos ejemplos, junto con la información proporcionada en los ejemplos de la presente invención, demuestran el potencial terapéutico de las nanoemulsiones de la presente invención.

Tabla 4. Composición y propiedades fisicoquímicas de nanoemulsiones funcionalizadas con varias moléculas terapéuticas.

COMPOSICIÓN	Molécula terapéutica	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial ζ (mV)	Eficacia de asociación (%)
V:SM 1:0,1	miARN	110±6	0,1	-9±1	15±1
V:SM 1:0,1	Docetaxel	120±3	0,1	-19±4	24±6
L:SM 1:0,2	Paclitaxel	157±5	0,1	-3±1	18±5
V:SM 1:0,1	Curcumina	121±2	0,1	-21±2	98 ±1
V:SM:OCT 1:0,1:0,01	miARN	150±3	0,1	-16±6	>90%
V:SM:DOTAP 1:0,1:0,1	ARNm	190±6	0,2	+27±2	>90%
V:SM:DOTA 1:0,1:0,1	ADNp	172±5	0,1	-8±1	>90%
V:SM:P 1:0,1:0,1	ADNp	167±17	0,2	+33±4	>90%

SM: esfingomielina; V: vitamina E; L: ácido linoleico; O: ácido oleico; OCT: octadecilamina; DOTAP: lípido catiónico; P: derivado de putrescina con una cadena de ácido oleico; miARN: microARN; ARNm: ARN mensajero; ADNp: ADN plasmídico.

PDI: índice de polidispersidad

ζ: potencial zeta

Aparte de asociar varios tipos de moléculas con actividad terapéutica y con el objetivo de desarrollar productos nanoteranósticos, se asociaron varios elementos que permiten la visualización/seguimiento de las nanoemulsiones, usando sistemas de obtención de imágenes ópticas (IVIS) y sistemas moleculares (TEP/SPECT/IRM). La tabla 5 muestra los elementos que se usaron, lo que demuestra que las nanoemulsiones de la presente invención tienen un posible valor diagnóstico.

Tabla 5. Elementos de obtención de imágenes que se han asociado con las nanoemulsiones

Partícula / Molécula				
Nanopartículas magnéticas (SPION)	Agentes quelantes	Radioisótopos	Marcadores fluorescentes	
Nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido oleico	DTPA-PE	68Ga, 18F	DiD, DiR, rojo Nilo, ICG, Alexa Fluor, Cy3, Cy5, Cy7	

5 Tabla 6. Composición y propiedades fisicoquímicas de nanoemulsiones funcionalizadas con varios agentes de contraste.

COMPOSICIÓN	Agentes de contraste	Tamaño (nm)	PDI	Carga superficial ζ (mV)
O:SM:LACT 1:0,1:0,1	-	139±8	0,2	-59±4
	DTPA	146±9	0,2	-59±6
	SPION	275±12	0,1	-57±1
	DTPA-PE + SPION	265±19	0,1	-61±3

SM: esfingomielina; O: ácido oleico; LACT: Lactisol; DTPA-PE: agente quelante; SPION: nanopartículas superparamagnéticas.

PDI: índice de polidispersidad

ζ : potencial zeta

Además de lo anterior, se estudió la toxicidad de las nanoemulsiones de la presente invención en cultivo celular y en ratones (figura 3). Se observó que apenas inducen toxicidad en cultivos celulares (A). La toxicidad no se ve alterada por la incorporación de un ligando en la superficie de las nanoemulsiones, y a modo de ejemplo, la toxicidad de las nanoemulsiones se presenta sin funcionalizar y funcionalizadas con el ligando Lactisol (B). Tampoco hubo ningún aumento en las muertes en comparación con el control (agua) en ensayos sobre embriones de pez cebra, después de 96 h de incubación. Y lo que es más importante, no se observó toxicidad aparente después de varias inyecciones intravenosas consecutivas de nanoemulsiones a concentraciones de 10 y 20 mg/ml en ratones sanos (C). Por tanto, se verifica que las nanoemulsiones de la presente invención muestran una baja toxicidad puesto que los componentes principales son lípidos naturales.

Por otro lado, y con el fin de determinar la eficacia de las nanoemulsiones de la invención, en particular de las nanoemulsiones de esfingomielina, se evaluó la internalización de dichas nanoemulsiones en células tumorales de diferente origen. A este respecto, se determinó que, en general, las nanoemulsiones de esfingomielina de la invención tienen una gran capacidad de internalizarse (figura 4). Pudo observarse mediante microscopía confocal que las formulaciones V:SM 1:0,1 cargadas con el fluoróforo rojo Nilo dieron lugar a una señal roja intensa alrededor de los núcleos de células contrateñidas con DAPI, independientemente del origen de las mismas (por ejemplo, colon, pulmón, próstata y páncreas) (A). Además, la eficiencia de internalización es variable y puede controlarse mediante la composición, puesto que, por ejemplo, las nanoemulsiones catiónicas V:SM:DOTAP (1:0,1:0,1) se internalizaron de manera más eficaz en células de colon en comparación con nanoemulsiones neutras V:SM (B). Se verificó que, de hecho, la señal correspondiente a las nanoemulsiones estaba en el citoplasma celular, marcada en verde, puesto que se usaron células tumorales transformadas para expresar la proteína verde (GFP); se observa colocalización del marcador correspondiente a las nanoemulsiones y el verde del citoplasma celular (C). Esta internalización eficaz de lugar a la liberación intracelular eficaz de las moléculas terapéuticas asociadas (figura 5). Al usar, por ejemplo, ácidos nucleicos marcados con un fluoróforo, Cy5, fue posible observar cómo las nanoemulsiones son capaces de transportarlo al citoplasma celular, puesto que, en este caso, la señal en el citoplasma celular de células tumorales transformadas con GFP corresponde al ARN marcado (A). En el caso de nanoemulsiones que incorporan nanopartículas magnéticas, es posible observar, por medio de microscopía electrónica de transmisión, el contraste de las mismas en vacuolas de células incubadas con esta formulación (B).

Por otro lado, se observó una mayor internalización en el caso de nanoemulsiones funcionalizadas. Esto es cierto, por ejemplo, en el caso de nanoemulsiones O:SM 1:0,1 marcadas con rojo Nilo y funcionalizadas con LAPI, en las que el número de células positivas para rojo Nilo fue mayor en el caso de esta formulación en comparación con respecto al control sin ligando (se observa un mayor desplazamiento de la curva y una mayor intensidad promedio) (figura 6). Este hecho se repite en el caso de nanoemulsiones O:SM 1:0,1 funcionalizadas con Lactisol (figura 7). En primer lugar, la señal de DiD encapsulado en las nanoemulsiones es mayor para las nanoemulsiones funcionalizadas (O:SM:Lact 1:0,1:0,1) (imagen inferior), lo que confirma que el grado de internalización es mayor que en el caso de nanoemulsiones de control (O:SM 1:0,1) (A). Además, se ha observado que, cuando las células tumorales expresan el receptor diana

con menos intensidad (en este caso, TAS1R3 en células SW620 cultivadas en condiciones normales (baja expresión) o con bajo contenido en glucosa (alta expresión)), la intensidad de la señal (B).

Además, se evaluó la eficacia de las nanoemulsiones de esfingomielina de la invención en cultivos celulares (figura 9). Los ensayos de citotoxicidad revelan que las nanoemulsiones (O:SM 1:0,1) pueden liberar de manera eficiente fármacos antineoplásicos y conducir a una disminución en la viabilidad celular (en este caso, etopósido), un efecto más pronunciado en el caso de nanoemulsiones funcionalizadas con un ligando (en este caso, Lactisol, O:SM:Lact 1:0,1:0,1) (A). Esto también se confirma para el caso de terapias dirigidas, tales como terapia génica. Las nanoemulsiones V:SM:DOTAP 1:0,1:0,1 y V:SM:P 1:0,1:0,1 son capaces de transfectar de manera eficiente células tumorales con plásmido que codifica para una proteína roja (mCherry), observándose una señal en el citoplasma celular (B). En el caso de plásmidos que codifican para un ARNinc, se observó un aumento significativo en su expresión (TG1), cuantificado mediante RT-PCR (C). En el caso de ARNip, usando uno que disminuye la expresión de luciferasa en células transformadas, se observa una reducción en la expresión de esta proteína (VDOTAP-CL3), comparable a la reducción que puede obtenerse con el vector de referencia comercial, Lipofectamine (D). También se evaluó la eficacia de las nanoemulsiones de esfingomielina en modelos animales (animales xenotrasplantados con células tumorales de cáncer de colon, SW620) (figura 9). Después de administrar las nanoemulsiones por vía intravenosa (O:SM:UROG 1:0,1:0,01), se observa un menor crecimiento tumoral, en relación con el control (animales que recibieron inyecciones de solución salina).

Basándose en todos los resultados comentados anteriormente, se demuestra el potencial de nanoemulsiones del tipo aceite en agua que comprenden un núcleo oleaginoso y estabilizadas por un esfingolípido, preferiblemente del tipo esfingomielina, para su uso como vehículo nanotecnológico, en particular para el tratamiento de enfermedad tumoral en estadios tempranos y más particularmente en cuanto a enfermedad metastásica. En este sentido, la presente invención demuestra que la funcionalización de dicho vehículo con ligandos contra receptores expresados en la membrana celular de células tumorales, en particular en la membrana de células tumorales diseminadas y metastásicas, lo convierte en una unidad con fuerte potencial terapéutico útil tanto para la encapsulación de fármacos antineoplásicos en dicho vehículo como para la incorporación de un agente de contraste para su uso en diagnóstico *in vivo*.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una nanoemulsión (denominada a continuación en el presente documento "*nanoemulsión de la presente invención*") del tipo aceite en agua (o/w), que comprende:

- una fase acuosa;
- una fase oleaginoso o un núcleo oleaginoso que comprende un aceite; y
- un esfingolípido seleccionado de la lista que consiste en esfingomielina, ceramida, esfingosina, gangliósido, globosa, psicossina y cerebrósido;

en la que la razón (p/p) esfingolípido/aceite es de entre 0,005 y 10.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el esfingolípido es esfingomielina.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la concentración del esfingolípido, preferiblemente del tipo esfingomielina, está a una concentración de entre el 1% y el 6% en peso con respecto al volumen total de la nanoemulsión (p/v).

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el aceite de la fase oleaginoso o del núcleo oleaginoso se selecciona de la lista que consiste en α -tocoferol (vitamina E), aceite de girasol, cacahuete, aguacate, argán, almendra, caléndula, coco, germen de trigo, árnica, borraja, sésamo, algodón, oliva (ácido oleico), semilla de ricino, soja, cártamo, palma, germen de trigo, árbol del té, jojoba, linaza, silicona, glicerol, aceites triglicéridos, hipérico, rosa mosqueta, miristato de isopropilo, tributirina, escualeno, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, la fase oleaginoso consiste en α -tocoferol (vitamina E), ácido oleico, ácido linoleico y/o triglicéridos.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, dicha nanoemulsión comprende además otros lípidos de membrana (fosfolípidos, esteroides y glicolípidos), y/o un lípido catiónico tal como DOTAP u octadecilamina, y/o una poliamina o derivados, así como derivados de los mismos con polietilenglicol.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, dicha nanoemulsión está funcionalizada con al menos uno de los siguientes elementos:

- moléculas terapéuticas; o
- elementos de contraste;

en la que las moléculas terapéuticas se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en:

- fármacos, preferiblemente fármacos antineoplásicos tales como carmofur, docetaxel con etopósido, paclitaxel, gemcitabina, o derivados de los mismos;
- ácidos nucleicos;
- péptidos;
- proteínas;
- anticuerpos o fragmentos de los mismos;
- aptámeros;
- moléculas orgánicas pequeñas;
- lípidos con actividad antitumoral tales como edelfosina;
- compuestos de origen natural con propiedades antitumorales tales como curcumina o resveratrol;

así como cualquier combinación de los mismos; y

en la que los elementos de contraste se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en:

- fluoróforos tales como indocianina verde (ICG), yoduro de 1,1-dioctadecil-3,3,3,3-tetrametilindotricarbocianina (DiR), perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3,3-tetrametilindodicarbocianina (DiD), rojo Nilo o Alexa Fluor;
- nanopartículas inorgánicas tales como partículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION);
- agentes quelantes tales como ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) o ácido 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-dietilentriamino-pentaacético (DTPA-PE) o ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTE) o NOTE modificado con un lípido para la complejación de gadolinio, o radioisótopos tales como galio o indio;
- otros radioisótopos tales como flúor (^{18}F), galio (^{68}Ga), yodo (^{125}I), indio (^{111}In), y derivados.
- perfluorocarbonos tales como perfluorohexano y octafluoropropano;

así como cualquier combinación de los mismos.

Por otro lado, los autores de la presente invención han identificado, en CTC (células tumorales circulantes) y en tanto tumores primarios como diseminados o metastásicos, un nuevo receptor, específicamente el receptor TAS1R3 (un receptor del gusto). La expresión de dicho receptor varía dependiendo de la presencia de glucosa, y de la línea y ubicación del mismo (más metastásico, mayor expresión).

Debido al enorme potencial de este receptor para el direccionamiento selectivo de moléculas, tales como nanopartículas, y teniendo en cuenta que se conoce la existencia de moléculas que interaccionan con este receptor, y no son endógenas, y, por tanto, no se producen fenómenos de competencia; se han seleccionado varios ligandos del receptor, en particular varios edulcorantes, para validar la hipótesis de que, al funcionalizar los nanosistemas de la presente invención con dichos ligandos, pueden dirigirse dichos nanosistemas contra tumores, tales como tumores primarios o células tumorales diseminadas, tales como CTC (células tumorales circulantes) y células metastásicas (véanse los ejemplos y las figuras).

Una vez funcionalizadas las nanoemulsiones, se observó que estas nanopartículas funcionalizadas se acumulan de manera más eficiente en células que expresan el receptor (figuras 6-11)

Por tanto, en otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la nanoemulsión de la presente invención está funcionalizada con ligandos tales como moléculas pequeñas, independientemente de que estén unidas o no a una cadena de carbonos, proteínas, péptidos o aptámeros, adecuados para la vehiculización celular. Preferiblemente, dicha nanoemulsión de la presente invención está funcionalizada con ligandos contra células tumorales que expresan determinados receptores de interés tales como TAS1R3, guanilil ciclase C, el receptor de leptina o moléculas tales como integrinas y laminina. En particular, dichos ligandos se seleccionan de la lista que consiste en el péptido Lactisol o brazzeína. Más preferiblemente, dicha nanoemulsión de la presente invención está funcionalizada con ligandos contra guanilil ciclase, leptina o el receptor TAS1R3, con ligandos seleccionados de la lista que consiste en péptidos; proteínas o fragmentos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, aptámeros, moléculas orgánicas de tamaño

pequeño, moléculas descritas como capaces de interaccionar con los mismos, o derivados.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la nanoemulsión de la presente invención está funcionalizada con uroguanilina, uroguanilina catalizada con lisinas, con la fracción extracelular de una integrina INT o con RPM (secuencia peptídica del péptido RPM: CPIEDRPMC).

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la nanoemulsión de la presente invención está doblemente funcionalizada con ligandos adecuados para la vehiculización celular y al menos una molécula terapéutica o un elemento de contraste, tal como se definió anteriormente.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener la nanoemulsión de la presente invención, que comprende: i) disolver los aceites y/o los esfingolípidos en etanol preferiblemente, o si es necesario en otros disolventes orgánicos miscibles con agua, o mezclas; ii) añadir esta fase a la fase acuosa, agua, soluciones salinas, disoluciones tamponadas o disoluciones de azúcares, con agitación magnética suave, u opcionalmente homogeneizando o aplicando ultrasonidos; iii) opcionalmente, añadir un compuesto, un agente de contraste, una molécula terapéutica o un ligando a una de las dos fases previas, dependiendo del compuesto con el que va a funcionalizarse la nanoemulsión y de sus propiedades de solubilidad; iv) alternativamente, pueden usarse sistemas microfluídicos para el mezclado de los componentes; v) también pueden prepararse nanoemulsiones usando diferentes métodos físicos para mezclar ambas fases, tales como mediante homogeneización o sonicación; vi) pueden funcionalizarse las nanoemulsiones mediante la adición de todos los componentes en el momento de la preparación, o incorporando los diferentes elementos en nanoemulsiones preformadas, a través de reacciones químicas o procedimientos físicos.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a la nanoemulsión de la presente invención, para su uso en terapia. En particular, para su uso en el tratamiento de cáncer, en particular de cáncer de mama, melanoma, melanoma uveal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de colon y recto, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de riñón y vejiga, y hepatocarcinoma. Más particularmente, para su uso en el tratamiento de metástasis del cáncer. Más particularmente, para su uso en diagnóstico *in vivo*.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanoemulsión de la presente invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Finalmente, tal como ya se mencionó, los autores de la presente invención han identificado, en CTC (células tumorales circulantes) y en tumores, un nuevo receptor, en particular el receptor TAS1R3 (véase el ejemplo 6). Además, en la presente invención se demuestra (véase la figura 7) que una vez funcionalizadas las nanoemulsiones de la presente invención con ligandos contra este receptor, se observa una acumulación intracelular de dichas nanoemulsiones de manera más eficiente en células que expresan el receptor, es decir, en células tumorales (véase el ejemplo 7).

Por tanto, un quinto aspecto de la invención se refiere a un compuesto del grupo seleccionado de la lista que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros o péptidos capaces de unirse al receptor TAS1R3, para su uso en la funcionalización de nanosistemas o conjugados frente a células tumorales. Preferiblemente, frente a células tumorales primarias, diseminadas o circulantes.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en el péptido derivado de leptina o brazzeína, preferiblemente brazzeína.

En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a una nanoemulsión de aceite en agua (o/w), que comprende: a) una fase acuosa; b) un núcleo oleaginoso que consiste en α -tocoferol (es decir, que el aceite del núcleo oleaginoso consiste en α -tocoferol); y c) esfingomielina (como estabilizador o tensioactivo).

Esta combinación específica (es decir, la combinación de una fase acuosa, un núcleo oleaginoso que consiste en α -tocoferol, y esfingomielina) confiere a la presente invención la oportunidad de obtener nanoemulsiones versátiles que van a usarse con propósitos tanto terapéuticos como de diagnóstico, que tienen una toxicidad reducida y también alta estabilidad durante el almacenamiento en medios salinos y en plasma.

En cuanto a la toxicidad de las nanoemulsiones de la invención, la presente invención ya explicó que se estudió la toxicidad de las nanoemulsiones de la presente invención en cultivo celular y en ratones (figura 3). En esta figura 3, se realiza el ensayo de viabilidad celular (MTT) de nanoemulsiones con diferentes composiciones VSM (vitamina E y esfingomielina 1:0,1). Se observó que apenas inducen toxicidad en cultivos celulares (figura 3A). La toxicidad no se ve alterada por la incorporación de un ligando en la superficie de las nanoemulsiones, y a modo de ejemplo, la toxicidad de nanoemulsiones se presenta sin funcionalizar y funcionalizadas con el ligando Lactisol (figura 3B). Tampoco hubo ningún aumento en las muertes en comparación con el control (agua) en ensayos sobre embriones de pez cebra, después de 96 h de incubación. Lo que es más importante, no se observa toxicidad aparente después de varias inyecciones intravenosas consecutivas de nanoemulsiones a concentraciones de 10 y 20 mg/ml en ratones sanos (figura 3C). Por tanto, se verifica que las nanoemulsiones de la presente invención muestran baja toxicidad puesto que

los componentes principales son lípidos naturales y neutros. Además, hágase referencia a la figura 13, que muestra un ensayo comparativo en el que se comparan nanoemulsiones que comprenden vitamina E + esfingomielina (VSM) con nanoemulsiones que comprenden vitamina E + ceramida (VCer6). Tal como puede observarse en la figura 13, la toxicidad de las nanoemulsiones que comprenden ceramida es significativamente mayor.

Esto es una indicación de que no todos los esfingolípidos son igualmente adecuados para obtener nanoemulsiones teranósticas no tóxicas porque, de hecho, las nanoemulsiones que comprenden ceramida son claramente tóxicas y, por tanto, no son apropiadas ni recomendables para propósitos de diagnóstico. Por tanto, en la presente invención, se eligió particularmente el esfingolípidos esfingomielina para obtener nanoemulsiones teranósticas debido a su toxicidad reducida.

Además, tal como se muestra en la figura 14, no todos los núcleos oleaginosos son igualmente adecuados para obtener nanoemulsiones teranósticas no tóxicas. Tal como se muestra en la figura 14, la combinación de esfingomielina con ácido linoleico (L) o con ácido oleico (O) demuestra que el uso de un núcleo oleaginoso tal como ácido linoleico (L) o ácido oleico (O) es altamente tóxico. Tal toxicidad se reduce significativamente cuando se usa vitamina E.

En cuanto a la estabilidad, es importante observar que las nanoemulsiones de la invención son altamente estables, en cuanto a sus propiedades coloidales, tanto durante el almacenamiento como en presencia de líquidos biológicos, tal como se muestra en la figura 2 de la solicitud tal como se presentó que trata sobre la estabilidad de nanoemulsiones basadas en esfingomielina y vitamina E. De hecho, tal como puede observarse en la figura 15, la nanoemulsión que comprende esfingomielina es más estable tanto durante el almacenamiento como en medio salino y en plasma, en comparación con las nanoemulsiones que comprenden otros esfingolípidos tales como ceramida, o un fosfolípido tal como fosfatidilcolina.

Además, los inventores de la presente invención han llevado a cabo ensayos comparativos que muestran la estabilidad de diferentes nanoemulsiones que comprenden todas ellas esfingomielina y diferentes núcleos oleaginosos (véase la figura 16). Curiosamente, la estabilidad de las nanoemulsiones que comprenden un núcleo de ácido linoleico u oleico disminuye claramente en comparación con la estabilidad mostrada cuando se usa vitamina E.

Además, y tal como se ilustra en la figura 17, en condiciones de estrés a 40°C y una humedad del 75% (condiciones requeridas u obligatorias para la aprobación regulatoria), las nanoemulsiones que tienen un núcleo de ácido oleico (OSM) o un núcleo oleaginoso diferente (Miglyol) y tensioactivo (fosfatidilcolina) son claramente inestables, mientras que las nanoemulsiones que comprenden vitamina E y esfingomielina son estables.

Los datos anteriores indican que no todos los lípidos o esfingolípidos son igualmente adecuados para obtener nanoemulsiones estables y no tóxicas. Por tanto, en la presente invención, se eligió particularmente la combinación del esfingolípidos esfingomielina y el núcleo oleaginoso vitamina E para obtener nanoemulsiones no tóxicas con alta estabilidad durante el almacenamiento, en medio salino y en plasma.

Los siguientes ejemplos sirven como función meramente ilustrativa de la invención, pero en ningún caso limitativa de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de las nanoemulsiones de la invención.

La preparación de las nanopartículas se llevó a cabo por medio de la técnica de inyección de etanol, para la cual se preparó una disolución madre con la razón aceite:tensioactivo (esfingolípidos en combinación o no con otros tensioactivos) necesaria en cada caso (fase orgánica, FO), y se inyectaron 100 µl (usando una jeringa de 0,5 ml de insulina Myjector, insulina U-100, Terumo) en 900 µl de H₂O (fase acuosa, FA) contenidos en un vial pequeño de 2 ml, y con agitación magnética. La formación de nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) se produjo de manera espontánea en estas condiciones, presentando una morfología esférica y dando lugar a poblaciones homogéneas (figura 1). La estructura consiste en un núcleo oleaginoso estabilizado por esfingomielina y a veces otros lípidos y, en principio, son sistemas adecuados para la encapsulación en el núcleo de moléculas hidrófobas, pudiendo asociarse también otro tipo de moléculas anfífilas o hidrófilas, que se dispondrán preferiblemente en la interfase o se asociarán sobre la superficie de las nanoemulsiones.

Para la caracterización de las formulaciones, se usó un dispositivo Zetasizer® (NanoZS Malvern Instruments, Inglaterra), que permite determinar el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) mediante dispersión dinámica de luz (DLS), así como su potencial (Z) mediante anemometría por láser Doppler (LDA). Todas las muestras se analizan después de la dilución con agua MilliQ, a temperatura ambiente, y con un ángulo de detección de 90°. A cada muestra se le realizan 3 mediciones y se proporciona el promedio. También se usa este tipo de mediciones para determinar la estabilidad coloidal de las formulaciones, o bien durante el almacenamiento o bien después de la incubación en medios más complejos, tal como se muestra en la figura 2.

Ejemplo 2. Optimización de los métodos de HPLC.

Se usó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para determinar la asociación a las nanoestructuras desarrolladas, tanto de los ligandos asociados como de las moléculas terapéuticas de interés.

Para la optimización de los métodos, se tuvieron en cuenta las características de cada molécula. En cuanto a los ligandos, se contemplan los compuestos descritos en la tabla 2, que después de su incorporación a la formulación, dan lugar a nanoemulsiones funcionalizadas tal como las mostradas en la tabla 3. En el caso de los péptidos, el análisis se llevó a cabo a 220 nm, con una combinación de agua y acetonitrilo como fase móvil, siendo suficiente habitualmente menos del 60% de acetonitrilo para la elución. También fue importante añadir a la fase móvil un pequeño porcentaje de TFA (0,2%), un agente de emparejamiento de iones altamente usado por su alta volatilidad (Agilent, 2013), que permite la separación de sustancias iónicas en columnas de HPLC de fase inversa mediante el control de la retención y de la selectividad. Además, en el caso de algunas moléculas anfífilas, como es el caso del derivado de Lactisol, se añadió un pequeño porcentaje de TFA (0,05%), puesto que tiene una estructura similar a un ácido graso y proporciona la ayuda ya mencionada. En algunos casos, también fue necesario ajustar la longitud de onda apropiada para el análisis, realizando barridos de UV-Vis con un espectrofotómetro de UV/Vis DU-730 (Beckman Coulter).

Del mismo modo, la caracterización de nanoemulsiones cargadas con fármacos, tales como las enumeradas en la tabla 4, tales como docetaxel y paclitaxel, se realizó mediante HPLC, con el fin de analizar la eficiencia de encapsulación del compuesto de interés. Para ello, se tuvieron en cuenta las características de cada uno de ellos, tales como la hidrofobicidad (LogP), puesto que los compuestos más hidrófilos eluyen con una fase móvil más polar (más agua) mientras que los compuestos más hidrófobos necesitan una fase móvil más apolar para su elución. Otros parámetros que se ajustaron fueron la temperatura y el volumen de inyección. En el caso de la temperatura, permite acelerar o retrasar la aparición del pico: si el pico aparece demasiado cerca del frente del disolvente, puede enfriarse la columna y, por tanto, retrasar la elución; mientras que si el pico aparece a tiempos largos, dando lugar a cromatogramas y análisis lentos, puede aumentarse la temperatura para acelerar la aparición del compuesto a través de la columna. En el caso del volumen de inyección, esto permite aumentar la altura del pico y, por tanto, mejorar el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Una vez optimizado el método, es importante garantizar que no existe ninguna interacción con los componentes de la nanopartícula, de modo que se altere el cromatograma. En todos los casos se usó un sistema de HPLC (1260 Infinity II, Agilent) equipado con una bomba G7111A, un inyector automático G7129A y un detector de UV-Vis G7114A, con una columna Infinitylab Poroshell 120EC-C18 (Agilent, 4,6 × 100 mm, 4 µm de tamaño de poro).

En el caso de ácidos nucleicos, el análisis para determinar la eficiencia de asociación se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa.

Ejemplo 3. Funcionalización de los nanosistemas.

Se funcionalizaron los nanosistemas desarrollados con los ligandos mencionados en la tabla 3. La caracterización de dichos nanosistemas desarrollados se realizó en cuanto a tamaño, dispersión y carga superficial, de la misma manera que en el caso de nanoemulsiones sin funcionalización (ejemplo 1). A continuación, el procedimiento seguido se agrupa en función del tipo de preparación en cuatro casos.

3.1. Funcionalización con conjugados lipídicos de péptidos, LAPI, UROG y RPM (V:SM:LAPI 1:0,1:0,01, O:SM:UROG 1:0,2:0,01 y V:SM:RPM 1:0,1:0,05).

La asociación de este ligando a las nanoemulsiones se realizó mediante la adición de 50 µl de una disolución madre de cada uno de los derivados después de su disolución en etanol (a una concentración de 1 mg/ml en el caso de LAPI y UROG o de 0,5 mg/ml para RPM) a la fase orgánica, a la que luego se le inyectó 1 ml de agua con agitación, para obtener las nanoemulsiones funcionalizadas.

3.2. Funcionalización con los péptidos hidrófilos (péptido catiónico derivado de uroguanilina O:SM:UROGLys 1:0,2:0,01 y péptido derivado de brazzeína O:SM:PC:BRA 1:0,1:0,1:0,005).

Para llevar a cabo la funcionalización con ambos péptidos, se comenzó con las formulaciones blancas preformadas (O:SM 1:0,2 y O:SM:PC 1:0,1:0,1). A 100 µl de estas nanoemulsiones con agitación magnética, 200 rpm, se les añadieron gradualmente otros 100 µl de disolución acuosa de péptido, mediante goteo. Una vez completada la adición, se mantuvo la agitación durante 20 minutos para favorecer la adsorción del péptido sobre la superficie de las nanoemulsiones preformadas. Se sometieron a prueba diferentes concentraciones de péptidos, que se caracterizaron tal como se describe en el ejemplo 1, y se determinó su estabilidad coloidal a las 24 h.

3.3. Funcionalización con un conjugado lipídico del ligando Lactisol (O:SM:LACT 1:0,1:0,1).

La asociación de este ligando (Lactisol unido covalentemente a una cadena C16-C18) a las nanoemulsiones se realizó mediante la adición de 50 µl de una disolución madre de 10 mg/ml a la fase orgánica (O:LM 1:0,1, en 50 µl de etanol),

a la que luego se le inyectó 1 ml de agua Milli-Q (sistema MilliporeMilli-Q®) con agitación magnética, para obtener la nanoemulsión funcionalizada.

3.4. Funcionalización con proteínas (integrina V:SM:INT 1:0,1:0,01 y leptina V:SM:LEPT 1:0,1:0,01).

Para llevar a cabo la funcionalización con ambas proteínas, se comenzó con las formulaciones blancas (V:LM, 1:0,1). En el primer caso, a 50 µl de nanoemulsiones preformadas con agitación magnética se les añadieron 25 µl de la disolución de integrina, y en el segundo, los volúmenes fueron de 100 µl y 50 µl para las nanoemulsiones preformadas y para la leptina, respectivamente.

Los resultados asociados con la internalización celular de nanoemulsiones funcionalizadas con un derivado de LAPI, Lactisol y RPM se muestran en las figuras 6, 7, 8 y 18, en las que puede observarse una fuerte acumulación de nanosistemas en células tumorales que expresan el receptor contra el que se ha funcionalizado la nanoemulsión.

Ejemplo 4. Asociación de moléculas de contraste a partículas funcionalizadas.

La encapsulación de nanopartículas superparamagnéticas (SPION) hidrófobas recubiertas con ácido oleico en las nanoemulsiones se llevó a cabo con el método descrito en el ejemplo 1 con pequeñas modificaciones. Se añadieron 15 µl de SPION disueltas en cloroformo a una concentración de 80 mg/ml a la fase orgánica, que se sometió a sonicación durante 5 minutos en un baño de hielo antes de su inyección en agua para la preparación de las nanoemulsiones con y sin ligando. Se agitó la suspensión durante 10 minutos en un agitador orbital. Finalmente, se caracterizaron según su tamaño, PDI y potencial zeta. También se añadió DTPA-PE para el posterior marcaje de las nanoemulsiones con ⁶⁸Ga y la visualización mediante TEP. En este caso, se incorporó DTPA-PE, previamente disuelto en etanol a una concentración de 20 mg/ml, a la fase orgánica, junto con los lípidos (1,25 µl, 2,5 µl o 5 µl), antes de producirse la inyección de esta fase orgánica en el medio acuoso, dando como resultado la formación de las nanoemulsiones.

Los resultados derivados de este tipo de asociación se muestran en la tabla 6 y en la figura 5, que muestra imágenes de células que han capturado mediante endocitosis dichas nanoemulsiones que incorporan SPION.

Ejemplo 5. Encapsulación de fármacos.

En el presente trabajo experimental, se encapsularon las moléculas terapéuticas de la tabla 4. Para la encapsulación de las moléculas hidrófobas, se prepararon disoluciones de las mismas en disolventes orgánicos, preferiblemente etanol, y se incorporó un pequeño volumen en la fase orgánica, junto con los lípidos, antes de la preparación de las nanoemulsiones. Por ejemplo, en el caso de paclitaxel, se preparó una disolución de 40 mg/ml en DMSO y se añadieron 1,25 µl a la fase orgánica (100 µl de lípidos en etanol). Las características de la formulación se detallan en la tabla 4. Se usó HPLC para determinar la concentración de fármaco en la suspensión coloidal (ejemplo 2).

En cuanto a la asociación de ácidos nucleicos, se asociaron con nanoemulsiones preformadas. Por ejemplo, en el caso de nanoemulsiones de putrescina (V:SM:P 1:0,1:0,1), descritas en la tabla 4, 100 µl de una disolución de pmCherry (5 µg) en 100 µl de la nanoemulsión, con agitación magnética. Después de 20 min de incubación, se caracterizaron las nanoemulsiones. Por medio de un gel de agarosa para electroforesis, se observó la ausencia de una banda de migración correspondiente al ADNp previamente asociado con las nanoemulsiones, confirmando de ese modo la eficacia de la asociación. Teniendo en cuenta el límite de detección de la técnica, puede concluirse que la eficiencia es superior al 90%.

Ejemplo 6. Expresión de biomarcadores en células tumorales.

Se analizó la expresión de varios biomarcadores de interés para determinar la funcionalización y el direccionamiento selectivo de las nanoemulsiones a células tumorales (figura 12). Por un lado, se realizó un análisis de expresión de TAS1R3 en muestras de tejido tumoral y parafina sana. Para ello, se realizó extracción de ARN a partir de 5 secciones de parafina de 14 micrómetros cada una usando un kit de extracción específico para muestras parafinizadas (kit RNeasy FFPE, QIAGEN). Con el fin de conocer la concentración de la misma, se usó el equipo Nanodrop (Nanodrop 2000C, Thermoscientific). Con estos datos, se llevó a cabo la normalización de la concentración de ARN en cada muestra, colocando un total de 2 µg en un volumen final de 10 µl con agua sin nucleasas. A continuación, se usó el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) y se usó un ciclador térmico (peq STAR 96HPL, VWR®) para la conversión de ARN en ADNc. Una vez obtenido el ADNc, se llevó a cabo la mezcla con la sonda específica para Tas1R3 junto con la mezcla maestra de PCR Taqman Universal. Se usó GAPDH como control o patrón, y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus, Applied Biosystems®.

En cuanto a la evaluación de la expresión en cultivos celulares, se usaron varios tipos de líneas celulares, obtenidos de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). Células de colon metastásicas de ganglio linfático (SW620, CCL-227), células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal (SW480, CCL-228 y HT-29, HTB-38), células epiteliales de

carcinoma de pulmón (A549, 185), células pulmonares metastatizadas al hígado (H1755, CRL-5892), células de carcinoma de páncreas (MIA PaCa-2, CRL-1420) y células de glioblastoma (U118, HTB-15, y U87MG, HTB-14). Se mantuvieron las líneas SW620, SW480, A549, U118 y U87MG en medio DMEM HG (medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido en glucosa, Sigma-Aldrich) y la línea H1755 en medio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies), ambos complementados al 10% con suero bovino fetal (Gibco®, Life Technologies) y al 1% con antibiótico (penicilina y estreptomina, Sigma-Aldrich). Todas se sometieron a prueba para determinar el micoplasma.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de TAS1R3, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), comenzando a partir de ARN extraído de todas las líneas celulares en cultivo. En primer lugar, se sometieron a tripsinización las células de manera rutinaria, y luego se contaron usando la cámara de Neubauer y, por tanto, pudieron aislarse 5 millones de células de cada línea para comenzar a partir de un número de células comparable. La extracción de ARN se llevó a cabo usando el kit de extracción (kit de purificación de ARN GeneJET, ThermoScientific), y el análisis se llevó a cabo de manera similar a la descrita en un párrafo anterior. Una vez terminado el procedimiento, se analizaron los datos. Las líneas celulares de cáncer colorrectal de origen metastásico, aisladas de ganglio linfático (SW620), son las que muestran una mayor expresión del mismo.

En cuanto a los estudios de inmunofluorescencia, se sembraron las células un día antes de realizar la prueba en una microcámara de 8 pocillos (PLC30108, SPL LifeSciences) o en cubreobjetos. Después de 24 horas, se retiró el medio de cultivo mediante aspiración y se lavó con PBS 1X, para proceder a fijar las células con paraformaldehído al 4%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS 1X dos veces, y luego se permeabilizaron las células con Triton 100-X al 0,2%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar el Triton, se incubaron las células con anticuerpos primarios y secundarios, tal como se describe en la siguiente tabla.

BIOMARCADOR	Anticuerpo primario	Condiciones de incubación	Anticuerpo secundario	Condiciones de incubación
TAS1R3	Anticuerpo policlonal de conejo Abcam ab65419	1:50 (1 hora, TA)	Anticuerpo anti-conejo con Alexa Fluor 488 Jackson Immunoresearch. 115-545-144	1:500 (1 hora, TA)
GCC	Anticuerpo policlonal de conejo Abcam ab107755	1:50 (1 hora, TA)	Anticuerpo anti-conejo con Alexa Fluor 488 Jackson Immunoresearch. 115-545-144	1:500 (1 hora, TA)
Receptor de leptina	Anticuerpo monoclonal de ratón [LPR-02] Abcam ab2143	1:50 (1 hora, TA)	Anticuerpo anti-ratón con Alexa Fluor 488 Immunoresearch. 115-545-003	1:500 (1 hora, TA)
Laminina-5	Anticuerpo monoclonal de ratón Dako [M7262]	1:50 (1 hora, TA)	Anticuerpo anti-ratón con Alexa Fluor 488 Jackson Immunoresearch. 115-545-003	1:500 (1 hora, TA)

Posteriormente se añadió Hoechst 33342 (Thermo Fisher®) (dilución 1:1000), y se incubó durante una hora, protegiendo al fluoróforo frente a la posible degradación por luz. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se lavó de nuevo con PBS 1X tres veces con agitación, para retirarlos de las paredes de la microcámara, aplicar el medio de montaje Mowiol (Calbiochem) y colocar el cubreobjetos sobre la muestra. Se dejó secar durante la noche a temperatura ambiente con protección frente a la oscuridad, y al día siguiente se almacenó a -20°C hasta su observación en el microscopio confocal (microscopio láser confocal de Leica SP8®).

Ejemplo 7. Estudios de interacción de las nanoemulsiones con células tumorales y liberación intracelular de las moléculas asociadas

Para estudiar la interacción de las nanoemulsiones con células tumorales, se prepararon nanoemulsiones fluorescentes mediante la adición de una pequeña cantidad de fluorocromo (rojo Nilo, DiD o DiR), disuelto en etanol, a la fase orgánica después de la formación de nanoemulsiones. El porcentaje de fluorocromo, en peso, se estableció entre el 0,001 y el 0,5%. Por ejemplo, se logró una eficiencia de asociación de entre el 85 y el 95% para nanoemulsiones V:SM 1:0,1 preparadas con rojo Nilo al 0,1%. Se confirmó que no hubo liberación del fluoróforo en el medio de cultivo (<3% en DMEM complementado con FBS, después de 4 h de incubación o <10% después del almacenamiento en una nevera durante 4 días). Después de 4 h de incubación de las nanoemulsiones con células tumorales endometriales (HEC1A) y de colon (SW480) que se habían transformado previamente para expresar GFP,

se lavaron las células y se fijaron con paraformaldehído. Después de montar la preparación con Mowiol (Calbiochem), se observaron bajo el microscopio confocal (microscopio láser confocal de Leica SP8®). Tal como se muestra en la figura 4, se observó fluorescencia roja, correspondiente a las nanoemulsiones marcadas con rojo Nilo, en los citoplasmas celulares, principalmente en células de colon. Se realizaron experimentos similares con nanoemulsiones marcadas con DiD, incubadas en diferentes tipos de células tumorales durante 4 h (colon, pulmón, próstata y páncreas), y se confirmó la capacidad de las nanoemulsiones V:SM 1:0,1 para acceder al interior celular, independientemente del tipo de línea celular (figura 4A). En cuanto a la composición de las nanoemulsiones, permite modular el grado de interacción. Al comparar, por ejemplo, la internalización celular de nanoemulsiones neutras (V:SM 1:0,1) y catiónicas (V:SM:DOTAP 1:0,1:0,1) cargadas con el fluoróforo DiR al 0,03%, después de 4 h de incubación en células de colon HCT116, se observa una mayor intensidad de fluorescencia en el caso de nanoemulsiones positivamente cargadas, probablemente debido a la contribución de la carga para el establecimiento de interacciones electrostáticas con la membrana celular.

Por otro lado, se ha confirmado que las nanoemulsiones no sólo son capaces de interactuar con las células diana, sino también de transportar moléculas/fármacos asociados al interior celular, nucleótidos (GUC CAG UUU UCC CAG GAA UCC CU) de doble cadena, de secuencia inespecífica, marcados con Cy5 O:SM:Lact 1:0,1:0,1, después de 4 h de incubación en células de colon.

Ejemplo 8. Estudios de interacción de nanoemulsiones funcionalizadas con células que expresan receptores diana.

La funcionalización de las nanoemulsiones con diferentes ligandos tuvo lugar tal como se describe en el ejemplo 3. Para estudiar el efecto de la funcionalización en cuanto a la capacidad de las nanoemulsiones de interactuar con células que expresan el receptor de interés, se usaron las técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal.

La figura 6 muestra datos del análisis de células SW620 analizadas mediante citometría de flujo, para determinar el número de células que muestran fluorescencia positiva, y la intensidad de la misma, atribuida a las nanoemulsiones cargadas con rojo Nilo que se habían internalizado después de 4 h de incubación a 37°C. El análisis se llevó a cabo después de lavar exhaustivamente las células con PBS, y luego preparando una suspensión de las mismas, siguiendo el protocolo de tripsinización habitual. Se sembraron 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, y se añadieron los nanosistemas durante 4 horas a 37°C. Después de ese tiempo, se lavaron las células y se sometieron a tripsinización, centrifugando a 150 RCF, durante 5 minutos a temperatura ambiente (CentrigugaSL 16R, rotor TX-400, ThermoScientific®), para separar las células del medio. Se retiró el sobrenadante mediante aspiración, se resuspendió el sedimento en PBS 1X y se transfirió a tubos especiales de citometría. Después de otra centrifugación a 150 RCF, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento restante en paraformaldehído al 0,4% en un volumen de 500 µl para la unión de las células. El análisis se llevó a cabo en un aparato FACScalibur, BectonDickinson®. En la figura 6 es posible observar cómo de eficazmente las nanoemulsiones funcionalizadas con LAPI se internalizan de manera más eficiente con células que sobreexpresan el receptor de leptina.

Para estudiar la internalización de nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol, se usaron células SW620, y se usó microscopía confocal. Para estos experimentos, se sembraron 80.000 células por pocillos en microcámaras de 8 pocillos (PLC30108, SPL LifeSciences). Después de 24 horas, se incubaron las células con nanoemulsiones preparadas a partir de ácido oleico y un derivado de esfingomielina marcada con NBD, que a su vez encapsulaba DiR (OLM; O:SM 1:0,1), y las mismas nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol (OLM-L; O:SM:Lact 1:0,1:0,1), a una concentración final en el pocillo de nanoemulsión de 0,12 mg/ml. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se lavaron las células con PBS 1X dos veces, y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, tras lo cual se lavaron los pocillos dos veces con PBS 1X, y luego se tiñeron los núcleos celulares con Hoechst 33342 (Thermo Fisher®). Se aplicó el medio de montaje (Mowiol, Calbiochem) y se observaron las muestras bajo el microscopio confocal (microscopio láser confocal de Leica SP8®). Se llevó a cabo un experimento similar comparando en este caso la internalización de las nanoemulsiones funcionalizadas con Lactisol (O:SM:Lact 1:0,1:0,1), y marcadas con DiD, después de la incubación en células SW620 con medio de cultivo con alta o baja concentración de glucosa y, por tanto, con diferentes niveles de expresión del receptor, tal como se observa en el ejemplo 6. Se halló que, eficazmente, la intensidad de fluorescencia debida a las nanoemulsiones disminuía en el caso de incubación en células SW620 con menor expresión del receptor TAS1R3 para Lactisol, tal como puede observarse en la figura 11.

Se obtuvieron resultados similares para las nanoemulsiones funcionalizadas con RPM (figura 8). Esta mayor internalización está relacionada con una mayor eficacia para liberar moléculas terapéuticas intracelulares asociadas, tal como se comenta en el ejemplo 7, con respecto a ensayos de viabilidad celular con nanoemulsiones O:SM:Lact 1:0,1:0,1 (F-NE) cargadas con etopósido. De manera similar, la figura 8 muestra la observación de microARN marcado con Cy5, que se había internalizado en las líneas celulares SW480 y SW620 después de transfectarse durante 4 h y a 37°C con nanoemulsiones de vitamina E, esfingomielina y octadecilamina (V:SM:OCT 1:0,1:0,01) funcionalizadas con RPM en las que el miARN se marcó con el fluoróforo Cy5 (VSMSTRPMmiARN) y nanoemulsiones de control (SMSTSHmiARN). Después del análisis de la fluorescencia mediante microscopía confocal, se observa una señal mucho mayor para las nanoemulsiones con RPM, que tienen una capacidad superior para liberar la molécula terapéutica asociada a nivel intracelular.

Ejemplo 9. Ensayos de eficacia terapéutica *in vitro*

Se sembraron (10.000 células por pocillo) en una placa de 96 pocillos las nanoemulsiones 1:0,1:0,1 (F-NE), cargadas con etopósido al 1% en peso, con respecto a los demás componentes, usando un ensayo que determina la viabilidad celular. Después de 24 h de cultivo, se aplicaron 20 µl de la formulación de prueba a 110 µl de medio de cultivo, en orden de concentración creciente, estableciendo como controles uno positivo, añadiendo el vehículo en el que se disuelve el nanosistema (agua en la mayoría de los casos), y uno negativo, o muerte total, en el que se aplicó una dilución de Triton 100-X al 6%. Después de 48 horas, se aspiró el medio de cultivo de la placa, lavando con PBS 1X, luego aplicando el reactivo MTT a una concentración de 5 mg/ml en PBS 1X, después dilución 1:10 en medio DMEM sin complementación, y se filtró con un filtro de 0,22 µm. Se aplicaron 110 µl por pocillo. Después de 4 horas en la incubadora, se retiró el medio de la placa, y se añadió un volumen de 110 µl de DMSO 1X (dimetilsulfóxido, 99,7%, Acros Organics) para disolver los cristales de formazano originados por las enzimas mitocondriales. Se incubó la placa con protección frente a la luz durante 15 minutos a 37°C, para medir entonces la absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro (Multiskan EX, ThermoLab Systems®) y obtener los valores de CE₅₀ de cada formulación, usando el programa GraphPad Prism 5. Para la encapsulación de un fármaco antineoplásico, se seleccionó etopósido, y se añadieron 13,75 µl de una disolución de 40 mg/ml (550 µg de fármaco) a la fase orgánica. Todas las nanoemulsiones se aislaron mediante centrifugación durante 30 minutos a 14000 x g a 15°C (microcentrífuga 5415R, rotor F452411 Eppendorf®), con el fin de eliminar todo lo que no formaba parte de las nanoemulsiones. Tal como se muestra en la figura 9A, se observó una mayor actividad citotóxica en el caso de células tratadas con nanoemulsiones con fármaco (las blancas apenas mostraron actividad), particularmente en el caso de nanoemulsiones funcionalizadas.

Ejemplo 10. Ensayos de eficacia terapéutica en modelo murino.

Para determinar la eficacia en modelo murino, en primer lugar se llevaron a cabo estudios de biodistribución mediante obtención de imágenes ópticas. Se marcaron las nanoemulsiones O:SM 1:0,1 y O:SM:UROG 1:0,1:0,01 con DiR, añadiendo el mismo a la fase orgánica después de la preparación de las nanoemulsiones (0,1%). Se inyectaron por vía intravenosa estas nanoemulsiones en la vena de la cola de ratones desnudos, hembras, que pesaban aproximadamente 25-30 g, a los que previamente (entre 6 y 8 semanas de edad) se les habían inoculado células SW620 en ambos flancos (5 millones en 100 µl de una mezcla de cultivo promedio:Matrigel 3:1; a las dos semanas, las mayoría de los tumores son palpables y tienen un volumen promedio de 150 mm³). El volumen medio de los tumores para este experimento fue de 500 mm³. 24 h después de la inyección de las nanoemulsiones funcionalizadas (O:SM:UROG 1:0,1:0,01) y cargadas con DiR, se sacrificaron los ratones, se extirparon los órganos y se observaron mediante obtención de imágenes ópticas (sistema de obtención de imágenes IVIS®). Tal como se muestra en la figura 10A, se detectó fluorescencia principalmente en el hígado y en el tumor. Además, se llevó a cabo un ensayo de eficacia terapéutica en ese mismo modelo de ratón. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 250 mm³, se clasificaron los ratones en dos grupos, uno de ellos el control, que no recibió tratamiento, y uno de ellos el que se trataría con nanoemulsiones funcionalizadas (O:SM:UROG 1:0,1:0,01) cargadas con etopósido. Se administraron por vía intravenosa cuatro inyecciones de nanoemulsión en un volumen total de 100 µl en la vena de la cola los días 1, 4, 8 y 11 (dosis de 0,2 mg/kg de etopósido). Se monitorizaron los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo, y se representó el aumento de volumen relativo para cada tiempo de evaluación (V_t/V_o = volumen a un tiempo/volumen al comienzo del estudio). Durante la duración del estudio, no se observaron efectos tóxicos. La figura 10B también muestra un menor aumento en el volumen tumoral en el grupo de ratones tratados, lo que revela el potencial de estas nanoemulsiones para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.

Lista de secuencias

<110> FUNDACIÓN PARA A INVESTIGACIÓN, DESENVOLVEMENTO E INNOVACIÓN RAMÓN DOMÍNGUEZ

SERVICIO GALLEGO DE SALUD

<120> Nanosistemas como vehículos selectivos

<130> 903 805

<140> documento EP18382012.5

<141> 15-01-2018

<160> 11

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> C18-PEG12

5

<220>
 <223> UROG

<400> 1
Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 10 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> UROGLys

20

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> 10
 <223> Disulfuro entre C en las posiciones 10 y 18

25

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> 13
 <223> enlace disulfuro entre Cys en las posiciones 13 y 21

30

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> 18
 <223> Disulfuro entre C en las posiciones 10 y 18

35

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> 22
 <223> enlace disulfuro entre Cys en las posiciones 13 y 21

40

<400> 2
Lys Lys Lys Lys Lys Asn Asp Asp Cys Glu Leu Cys Val Asn Val
 1 5 10 15
Ala Cys Thr Gly Cys Leu
 20

<210> 3
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> BRA

50

<400> 3
Cys Phe Tyr Asp Glu Lys Arg
 1 5

55

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> C18-PEG

<220>
 <223> RPM

5 <400> 4
 Cys Pro Ile Glu Asp Arg Pro Met Cys
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido RPM

15 <400> 5
 Cys Pro Ile Glu Asp Arg Pro Met Cys
 1 5

<210> 6
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> RPM

<400> 6
 Val Ser Met Ser Thr Arg Pro Met
 1 5

30 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Control

<400> 7
 Val Ser Met Ser Thr Ser His
 1 5

40 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> RPM-miARN

<220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> 8
 <223> miARN

<400> 8
 Val Ser Met Ser Thr Arg Pro Met
 1 5

55 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Control-miARN
 <220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> 7
 <223> miARN
 <400> 9
 Val Ser Met Ser Thr Ser His
 1 5
 10 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 1
 <223> C18-PEG8
 20 <220>
 <223> LAPI
 <400> 10
 Leu Asp Phe Ile Lys
 25 1 5
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ARN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Nucleótido
 35 <400> 11
 guccaguuuu cccaggauc ccu

23

REIVINDICACIONES

1. Nanoemulsión de aceite en agua (o/w), que comprende:
 - a. una fase acuosa;
 - b. un núcleo oleaginoso que comprende α -tocoferol (vitamina E); y
 - c. esfingomielina.
2. Nanoemulsión, según la reivindicación 1, en la que dicha nanoemulsión está funcionalizada con al menos uno de los siguientes elementos
 - a. moléculas terapéuticas; y/o
 - b. agentes de contraste.
3. Nanoemulsión, según la reivindicación 2, en la que dichas moléculas terapéuticas se seleccionan de la lista que consiste en: fármacos antineoplásicos tales como carmofur, docetaxel con etopósido, 5-fluoracilo, paclitaxel, gemcitabina, edelfosina, fármacos antiinflamatorios o antiangiogénicos, tales como curcumina, verteporfina y/o resveratrol; ácidos nucleicos tales como ADNp, ARNhc, miARN o ARNm; biomoléculas tales como péptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y aptámeros; así como cualquier combinación de los mismos.
4. Nanoemulsión, según la reivindicación 2, en la que los elementos de contraste se seleccionan de la lista que consiste en fluoróforos, SPION o radioisótopos, perfluorohexano y octafluoropropano, así como cualquier combinación de los mismos.
5. Nanoemulsión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha nanoemulsión está funcionalizada con ligandos adecuados para la vehiculización celular.
6. Nanoemulsión, según la reivindicación 5, en la que dichos ligandos son ligandos capaces de unirse al receptor TAS1R3.
7. Nanoemulsión, según la reivindicación 6, en la que dichos ligandos se seleccionan de la lista que consiste en el péptido derivado de brazzeína o el edulcorante Lactisol.
8. Nanoemulsión, según la reivindicación 5, en la que dicha nanoemulsión está funcionalizada con ligandos contra el receptor de leptina, guanilil ciclase, o con uroguanilina, uroguanilina modificada con lisinas, con la fracción extracelular de una integrina, o con RPM.
9. Nanoemulsión, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha nanoemulsión comprende además otros lípidos de membrana, y/o un lípido catiónico, y/o una poliamina, y/o polietilenglicol (PEG), y/u otros tensioactivos o polímeros de recubrimiento, dispuestos en la interfase de la nanoemulsión.
10. Nanoemulsión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en terapia y/o diagnóstico *in vivo*.
11. Nanoemulsión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, melanoma, melanoma uveal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de colon y recto, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer de riñón y vejiga, o hepatocarcinoma.

Fig. 1

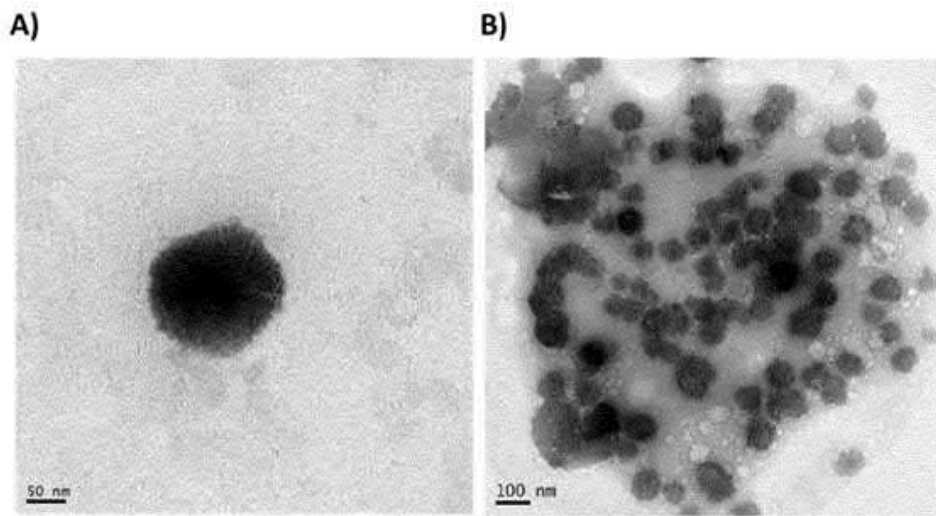


Fig. 2

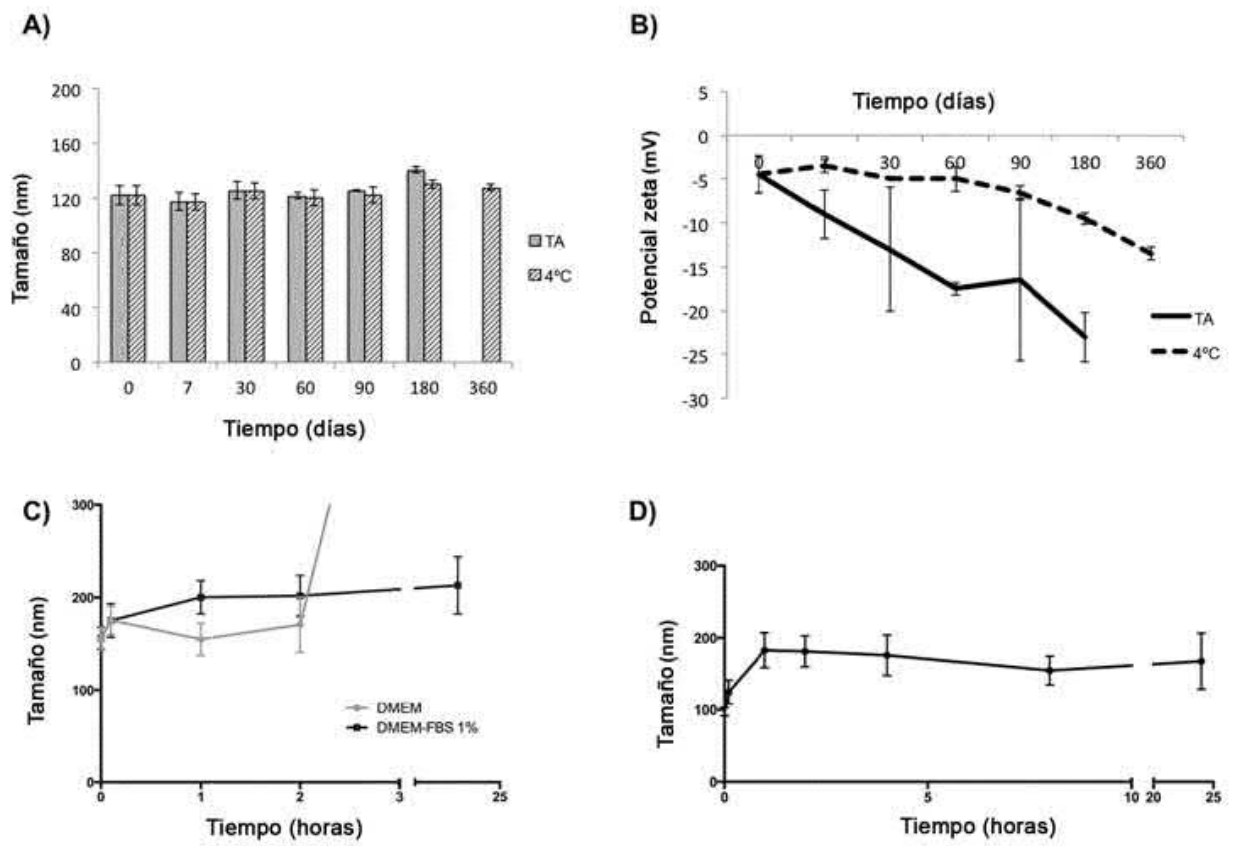


Fig. 3

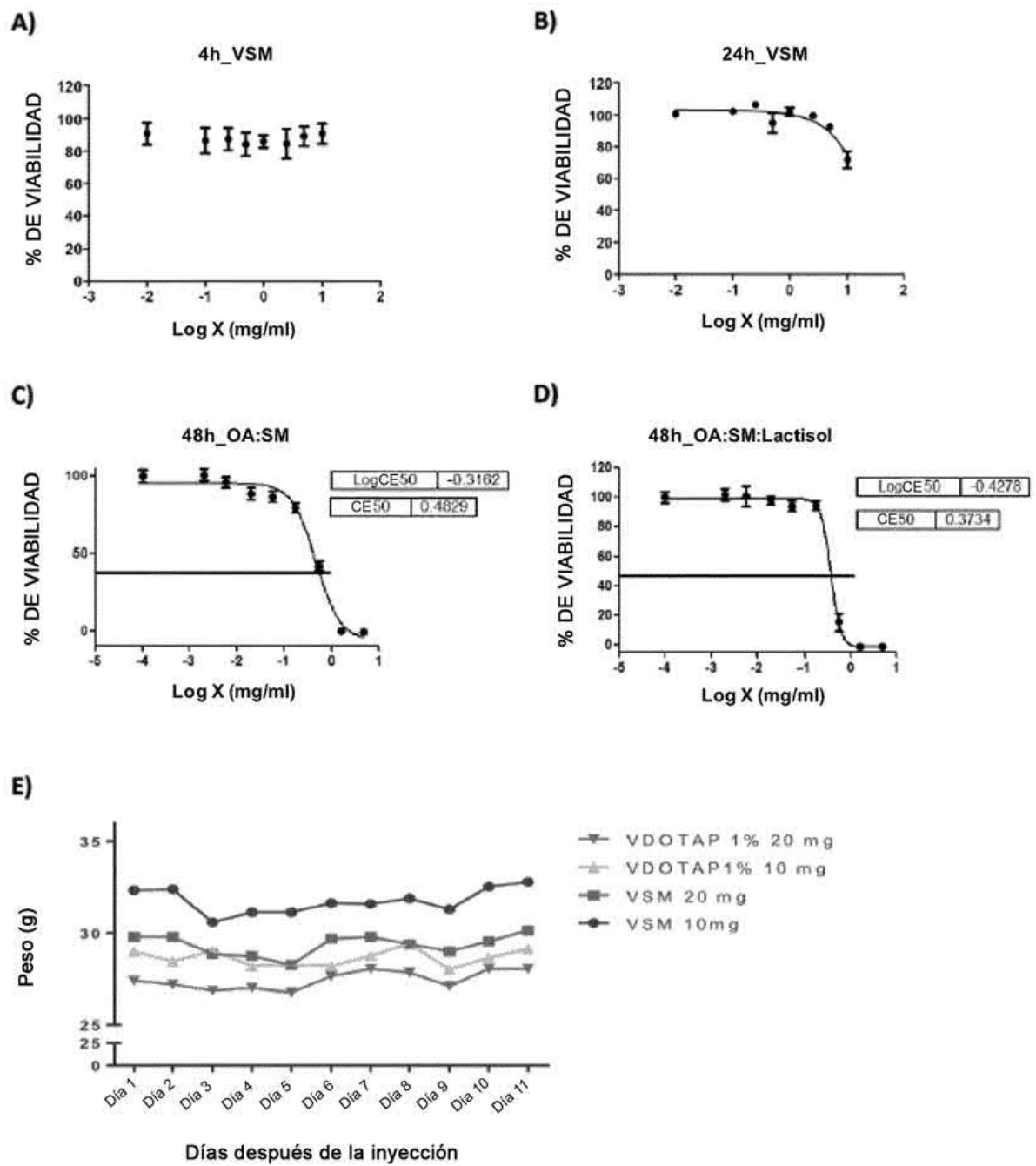
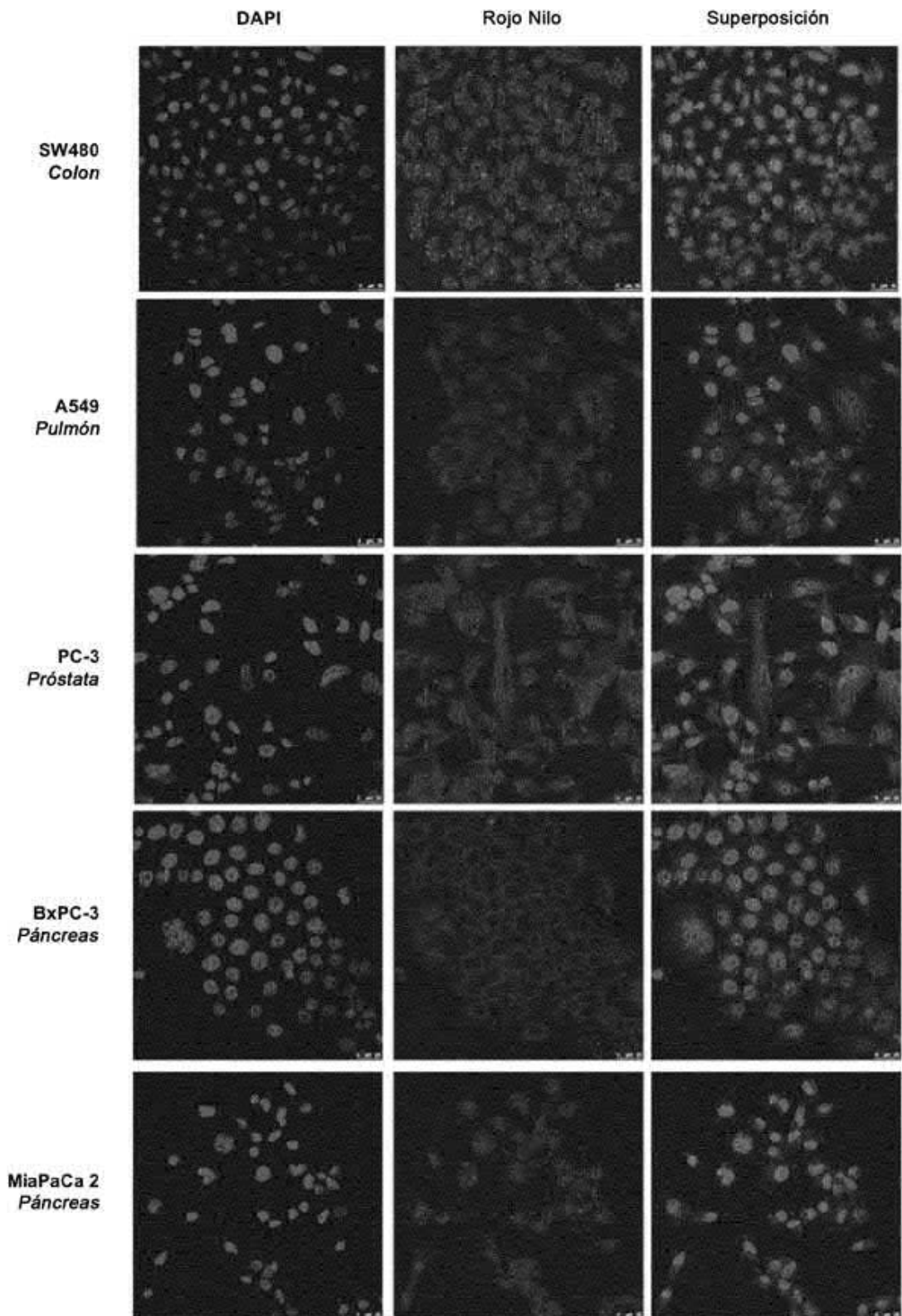
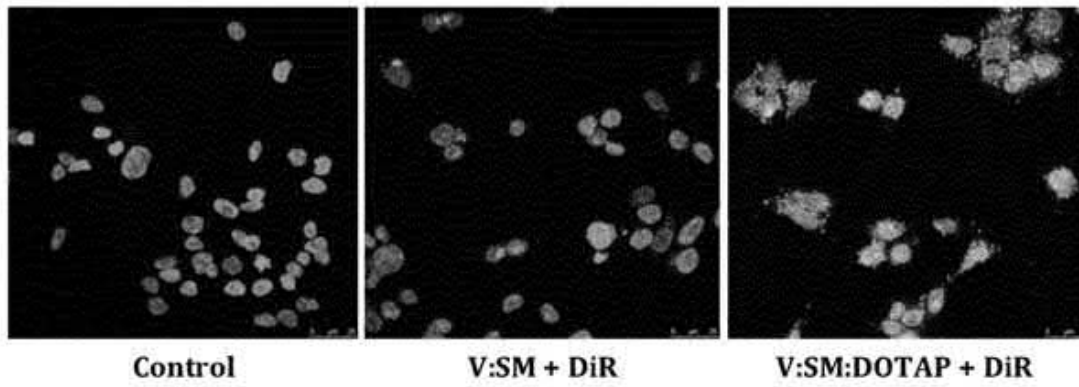


Fig. 4

A)



B)



C)

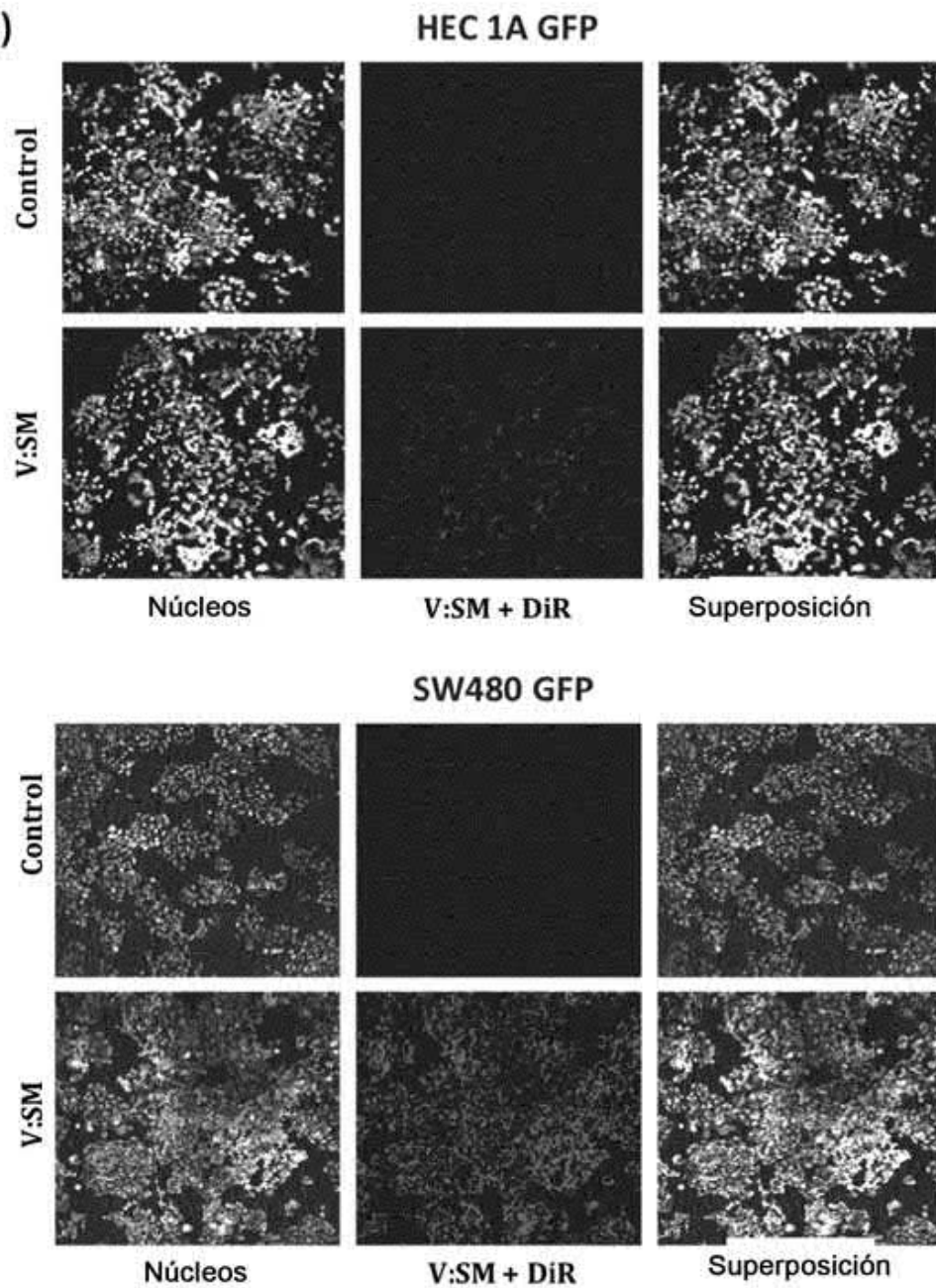


Fig. 5

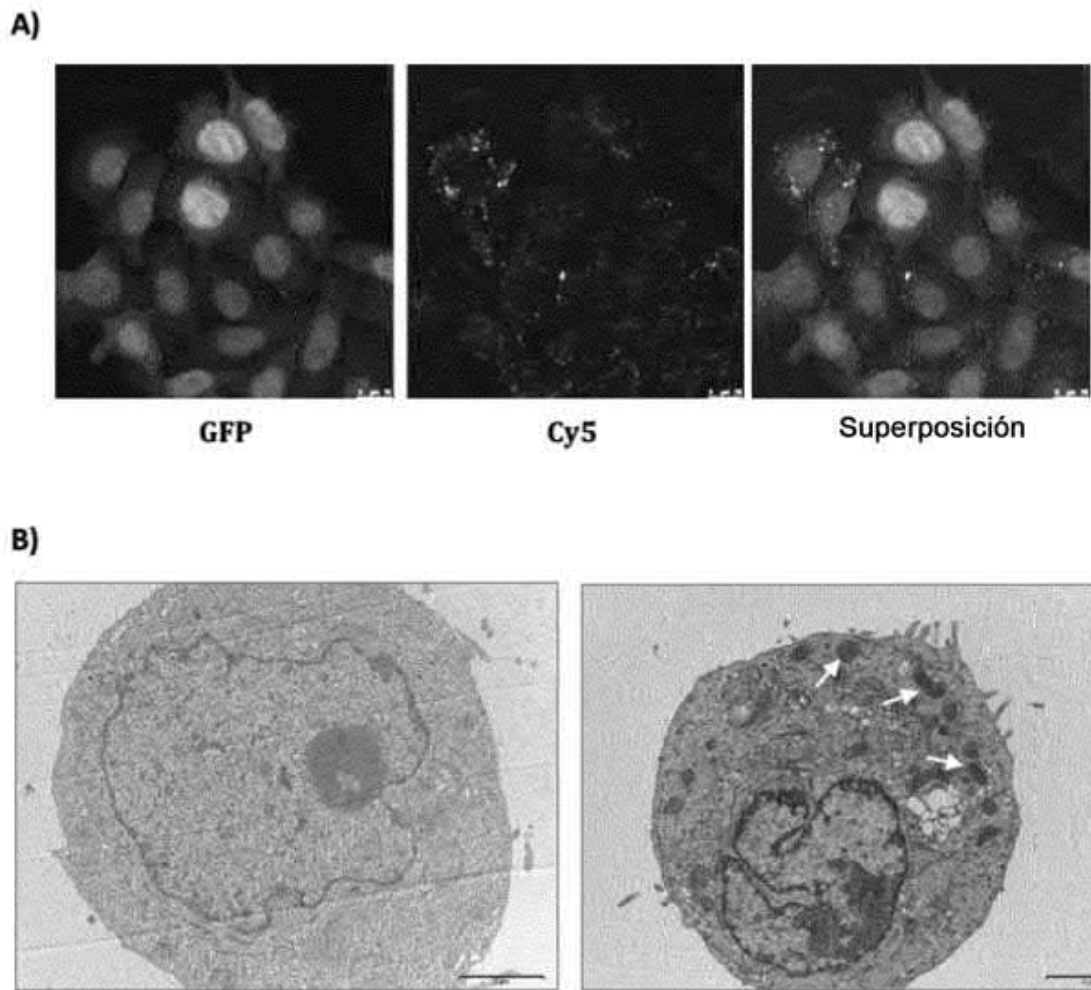


Fig. 6

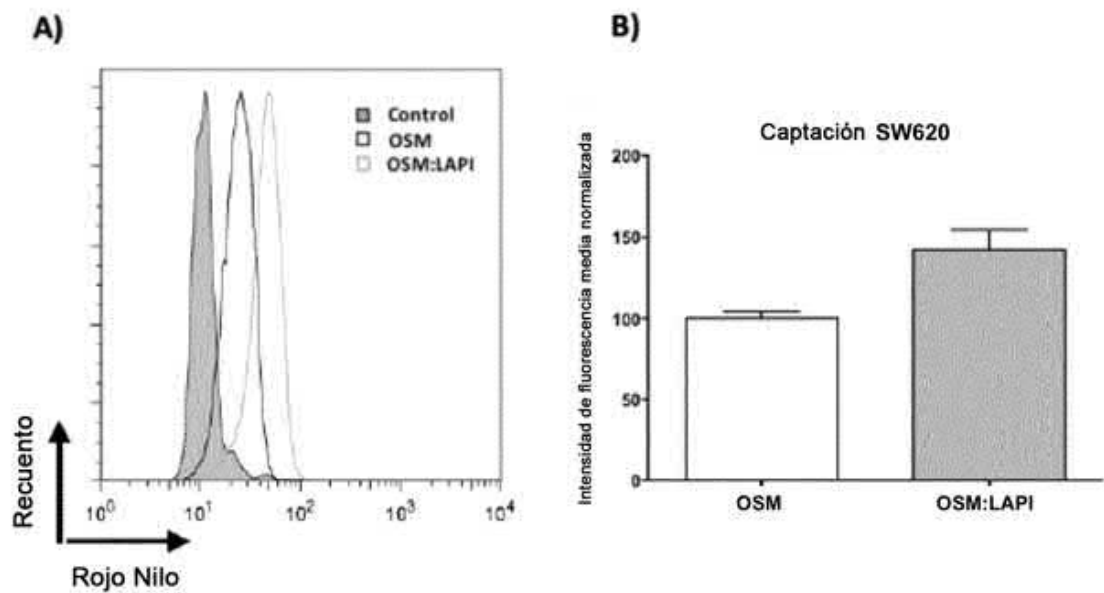


Fig. 7

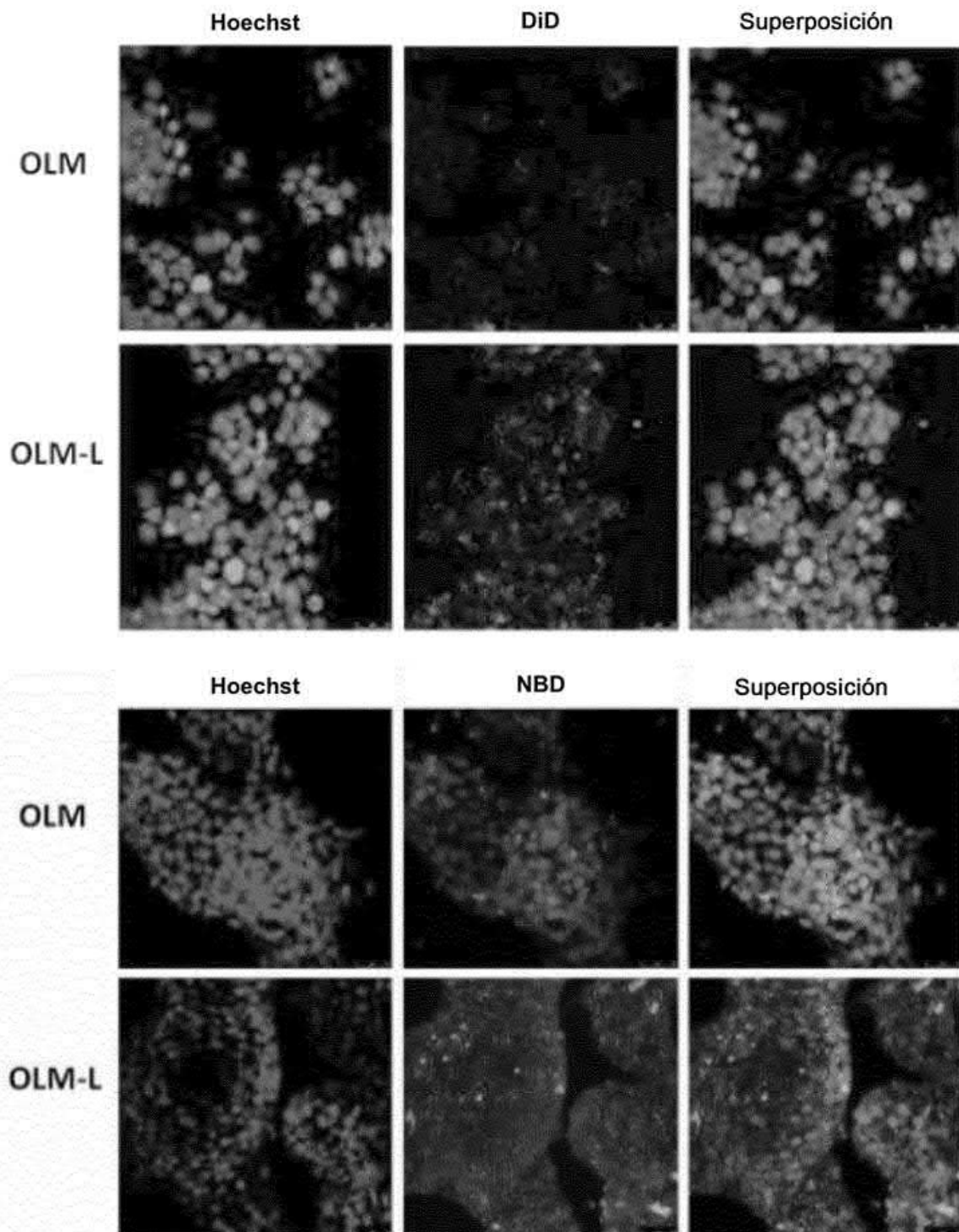


Fig. 8

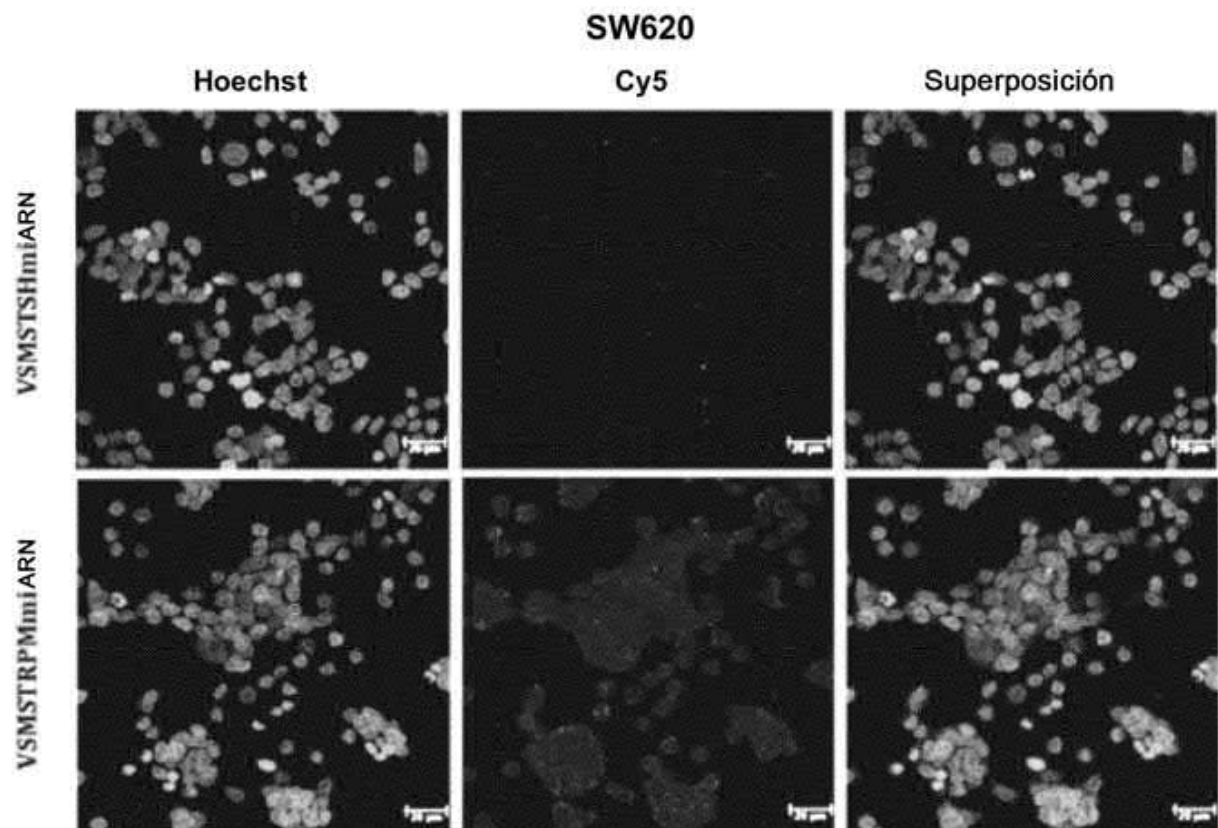
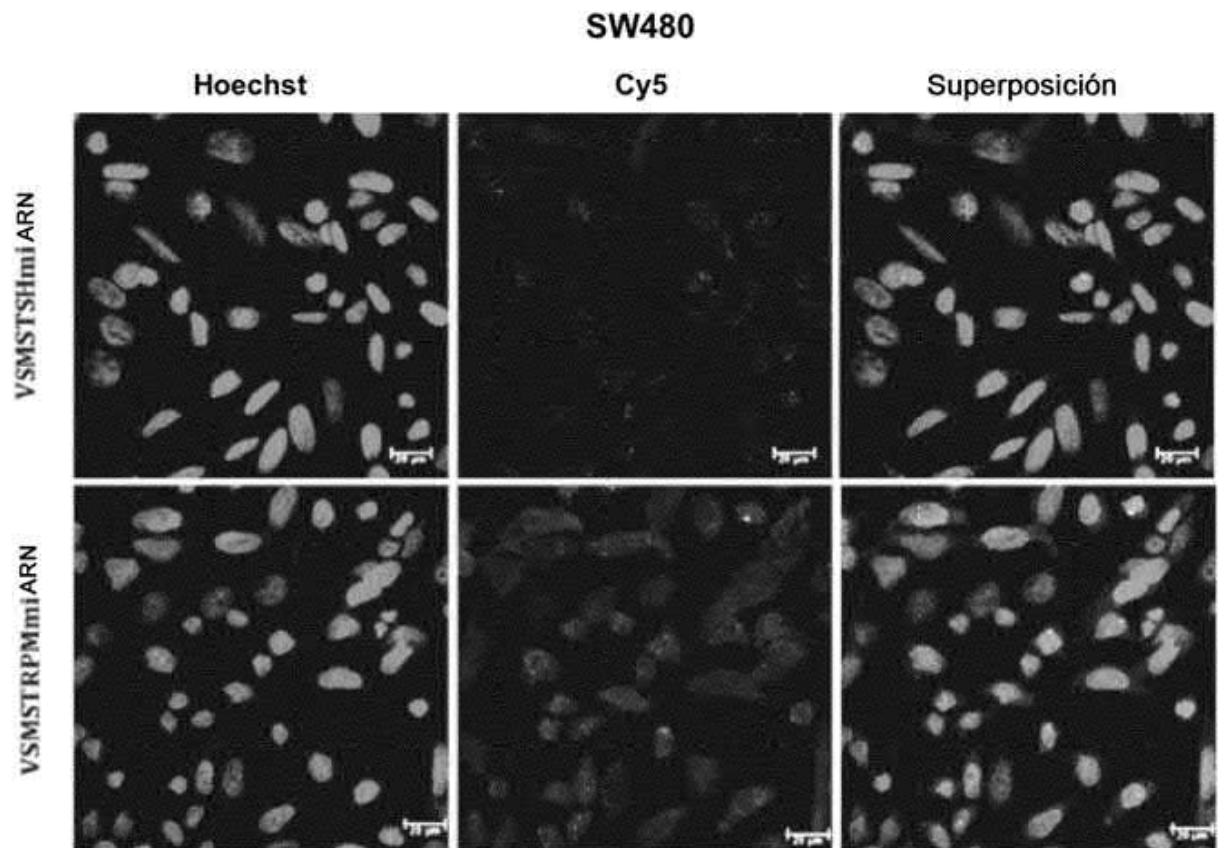
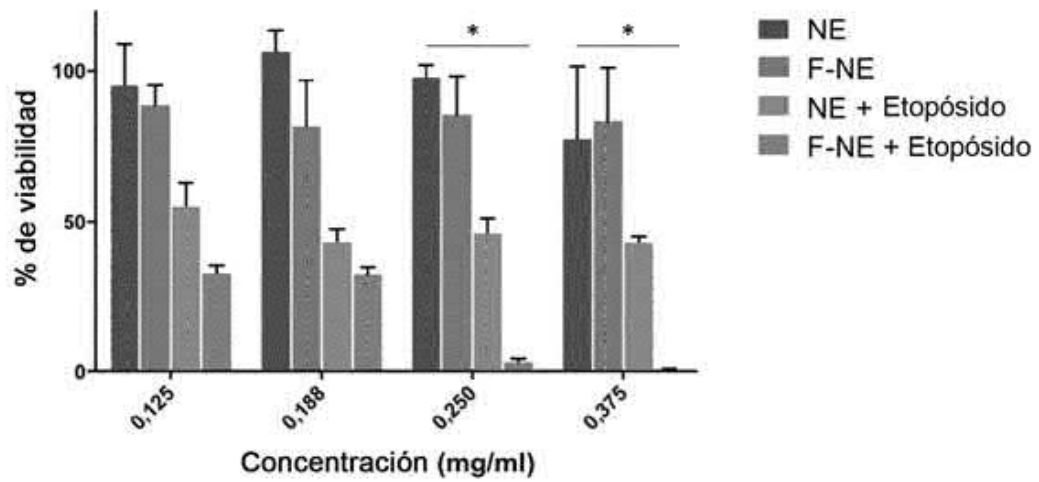
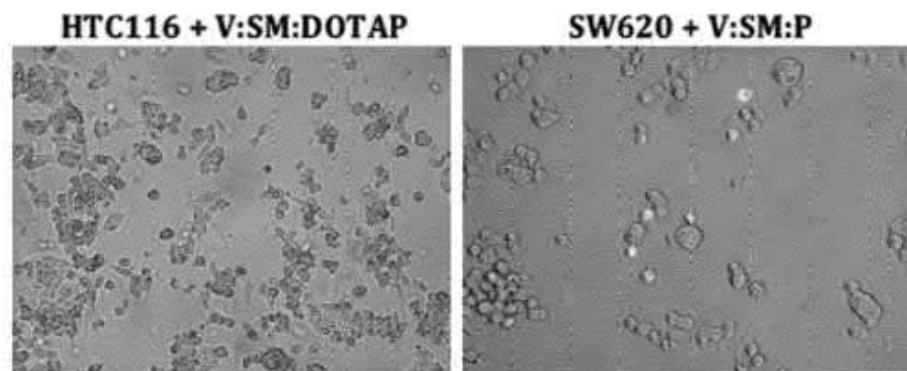


Fig. 9

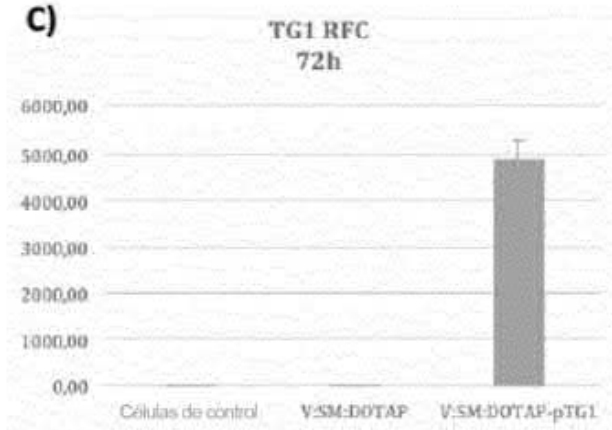
A)



B)



C)



D)

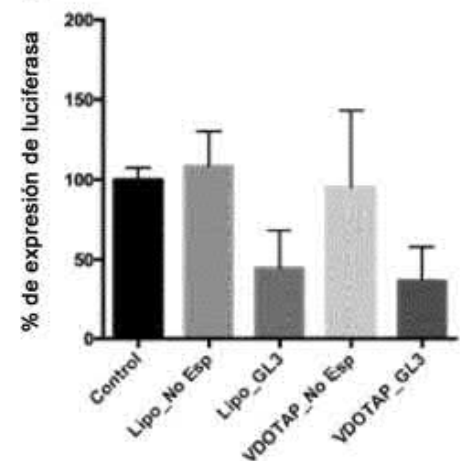
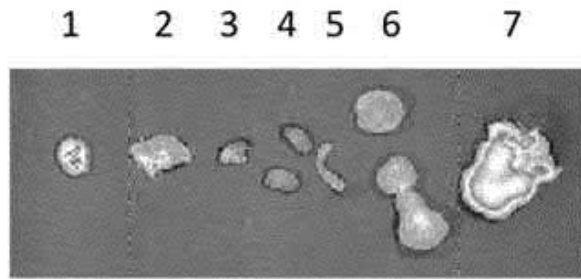


Fig. 10

A)



- | | |
|------------|------------|
| 1. Cerebro | 5. Bazo |
| 2. Pulmón | 6. Tumores |
| 3. Corazón | 7. Hígado |
| 4. Riñón | |

B)

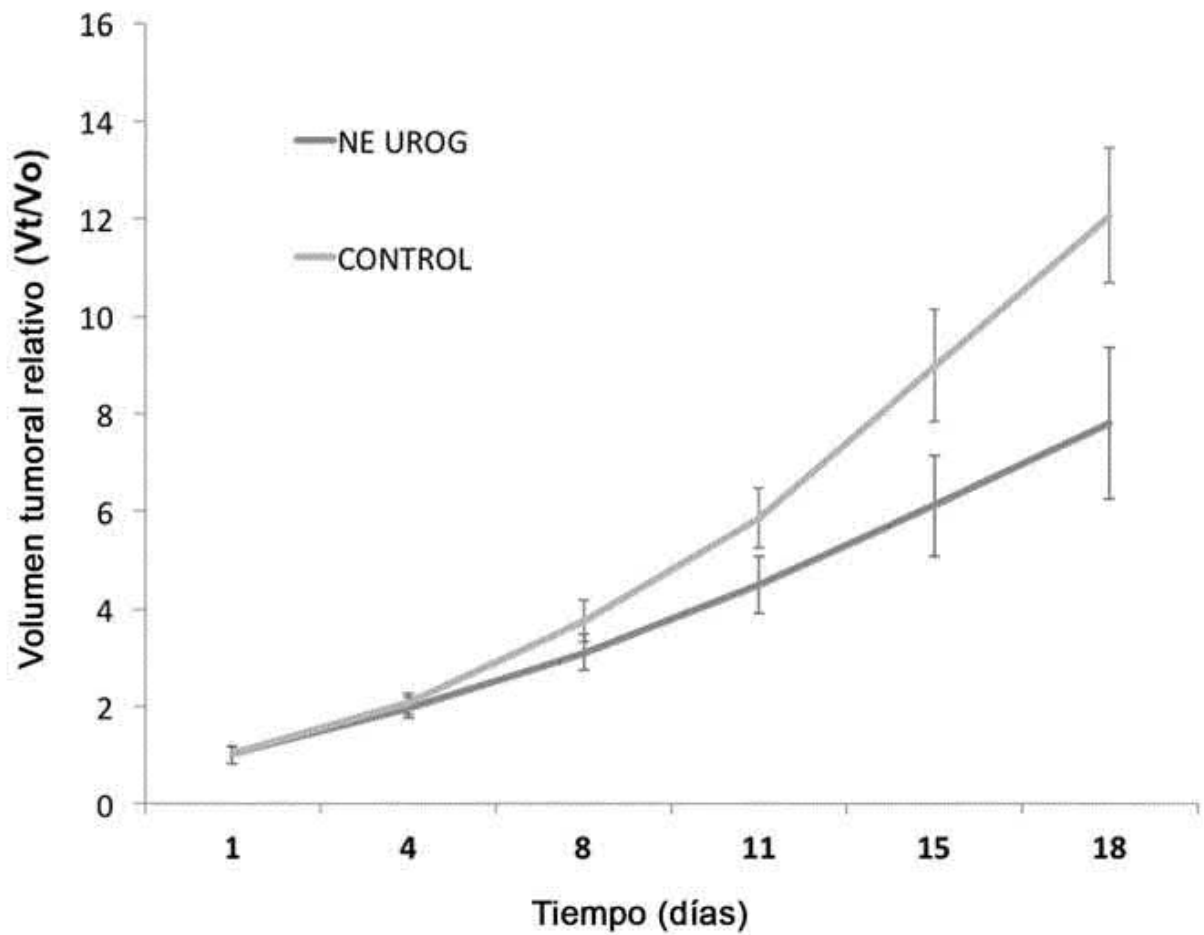


Fig. 11

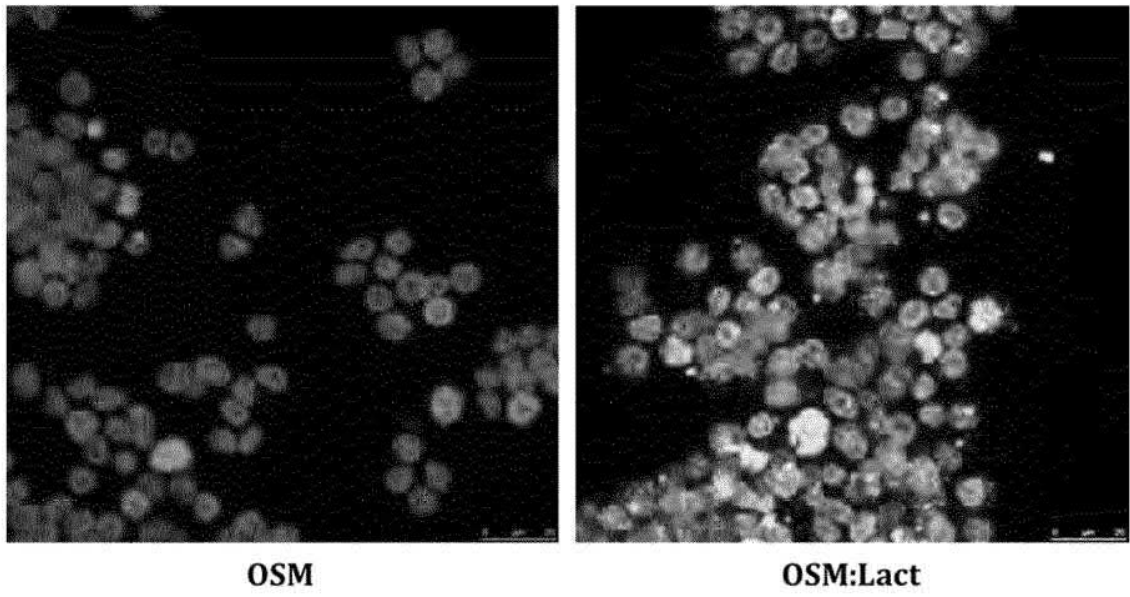
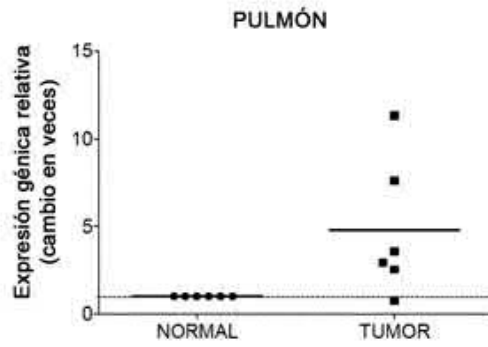
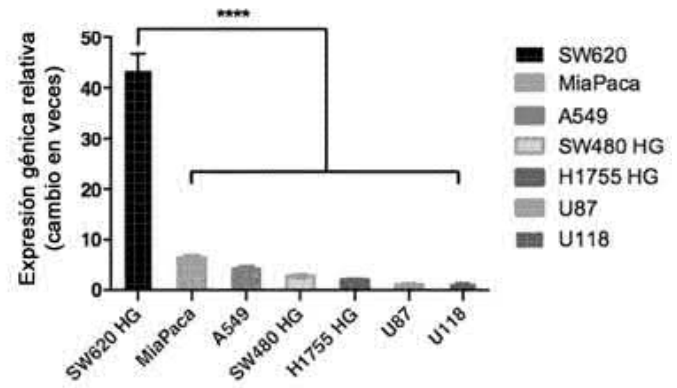


Fig. 12

A)



B)



C)

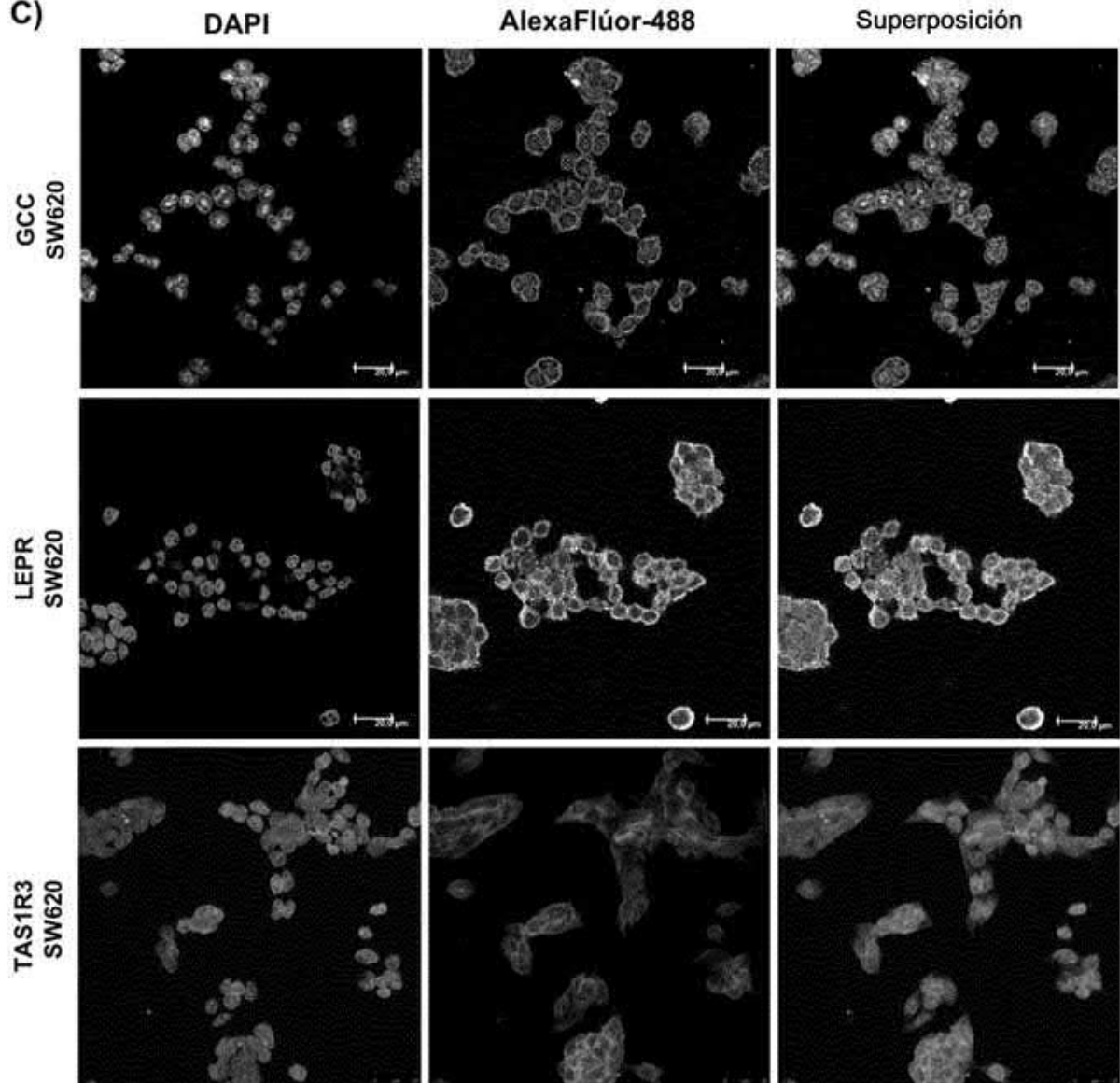


Fig. 12 (Cont.)

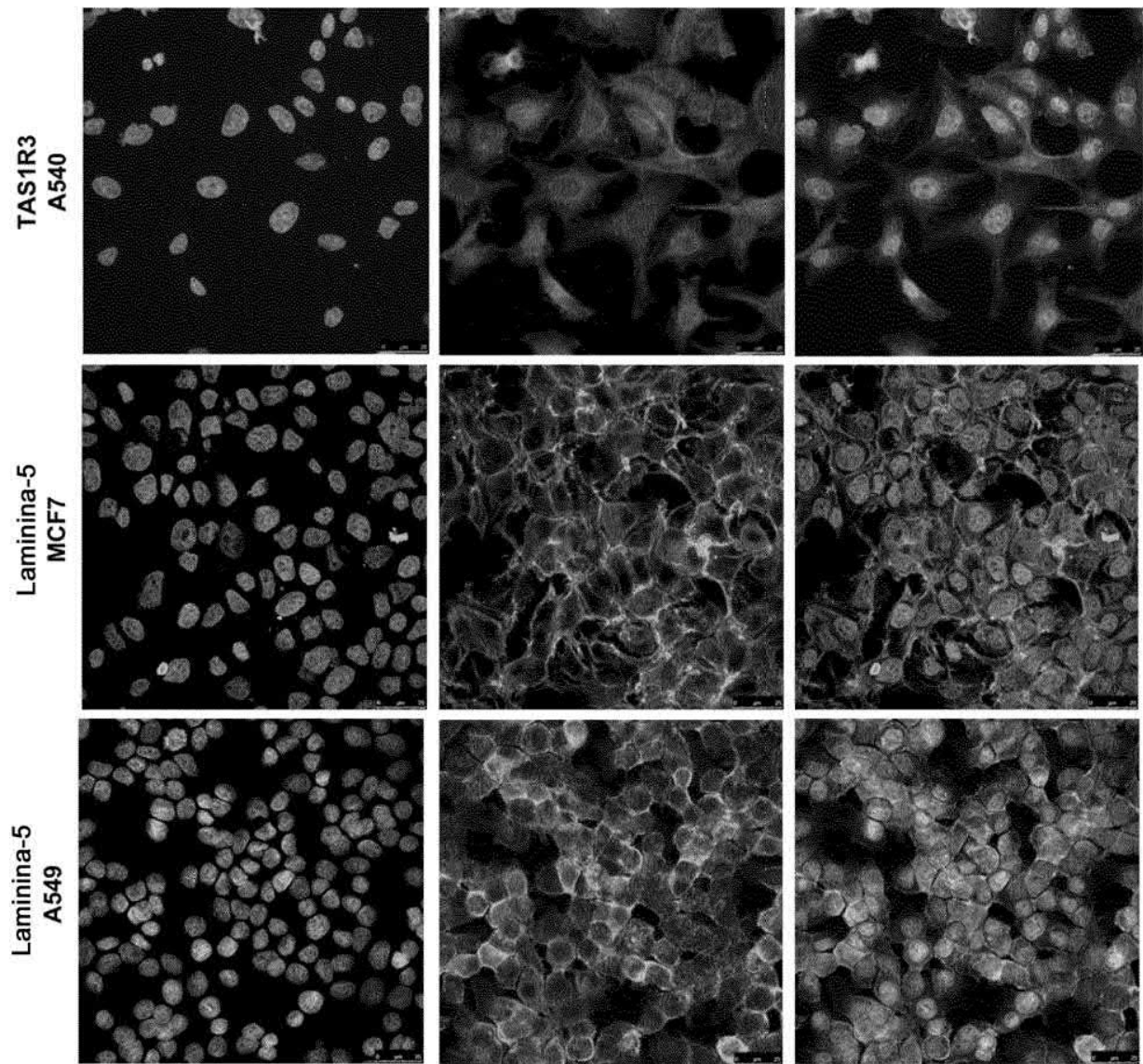


Fig. 13

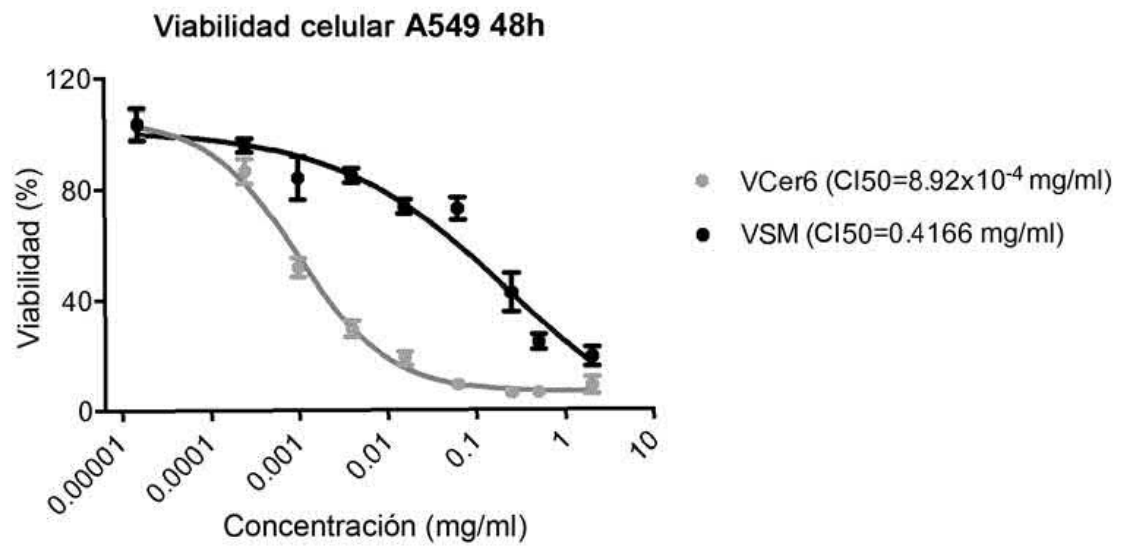


Fig. 14

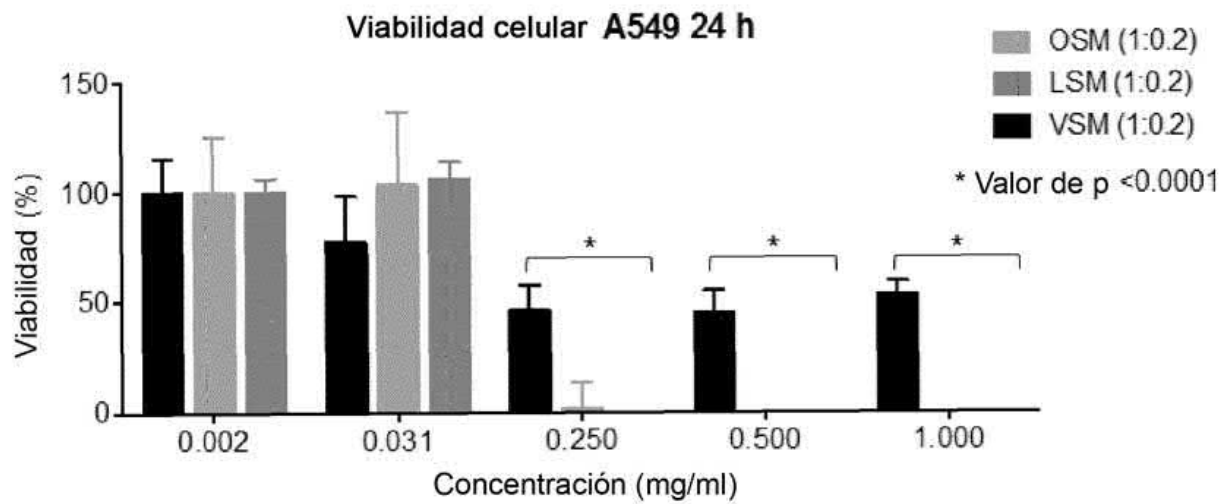


Fig. 15

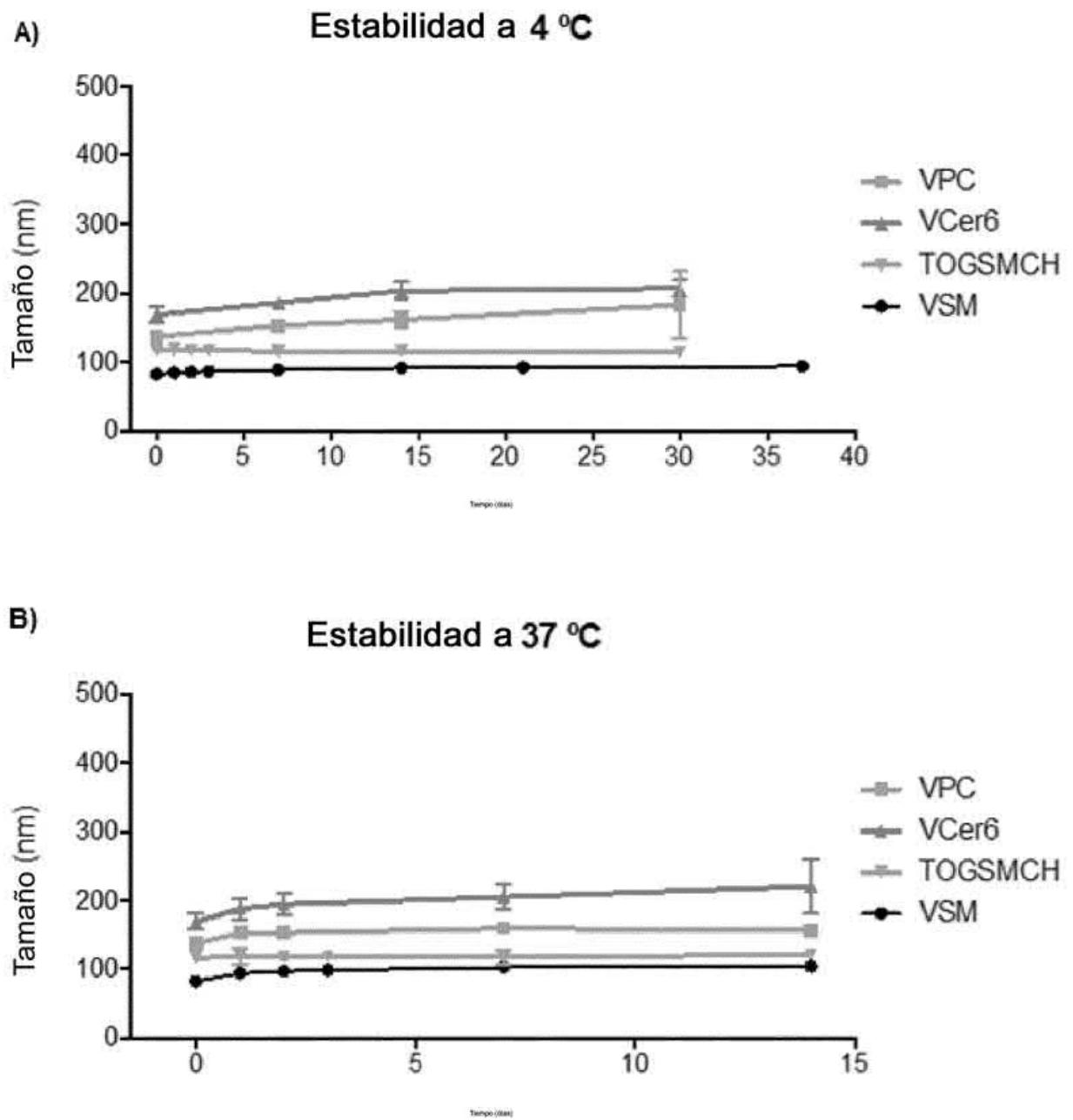
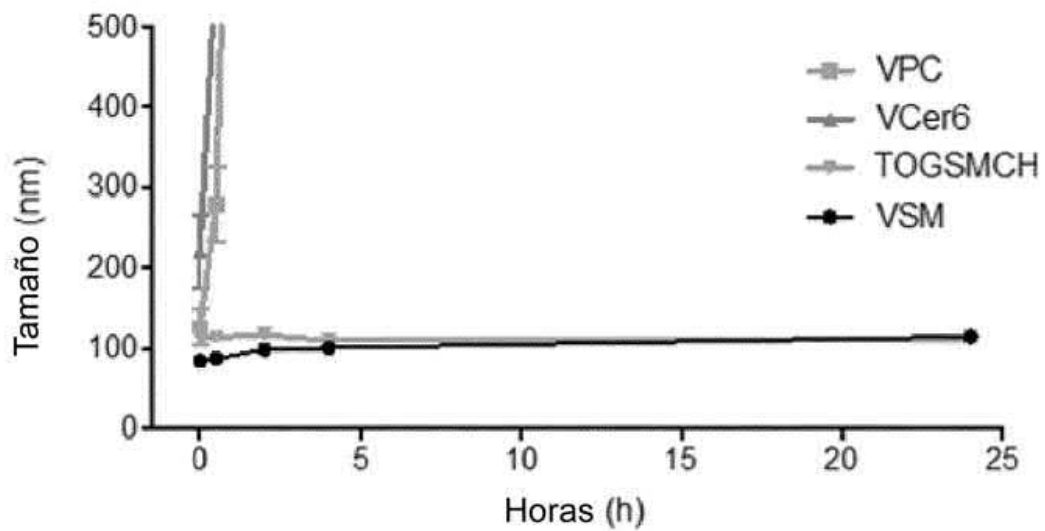


Fig. 15 (Cont.)

C) Estabilidad en PBS 10 mM



D) Estabilidad en plasma

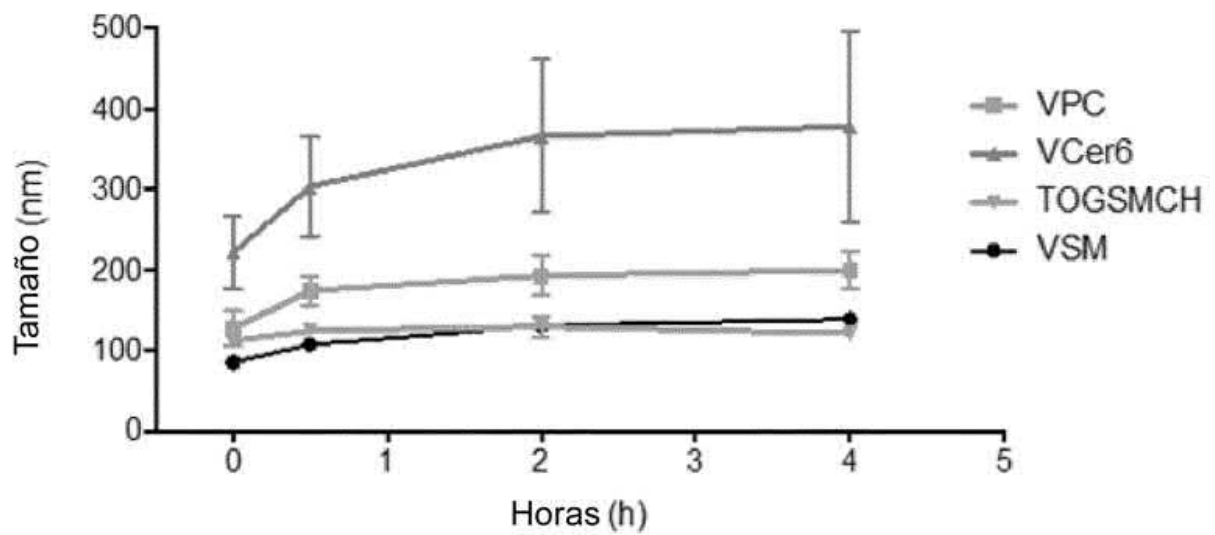
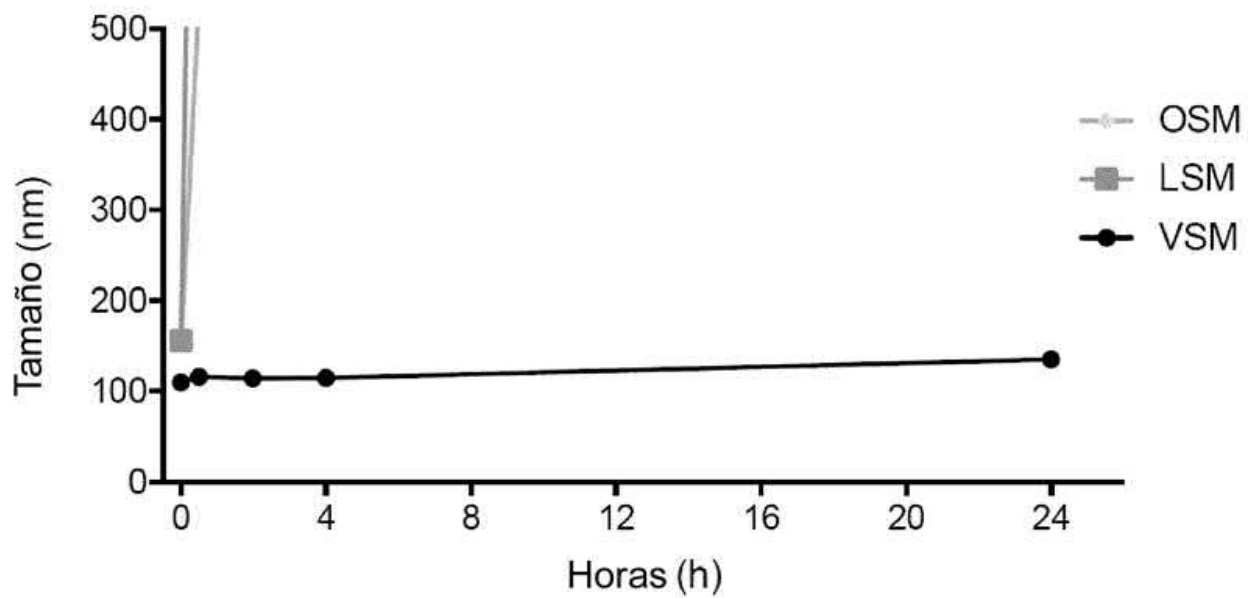


Fig. 16

A)

Estabilidad en PBS 100 mM

B)

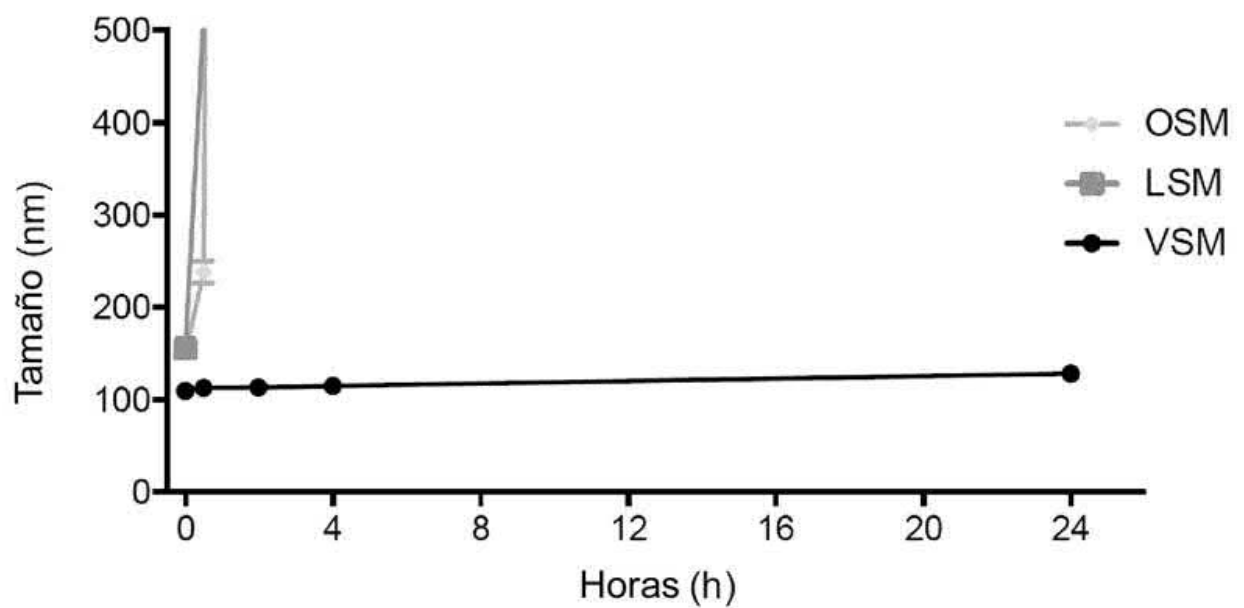
Estabilidad en PBS 50 mM

Fig. 16 (Cont.)

c)

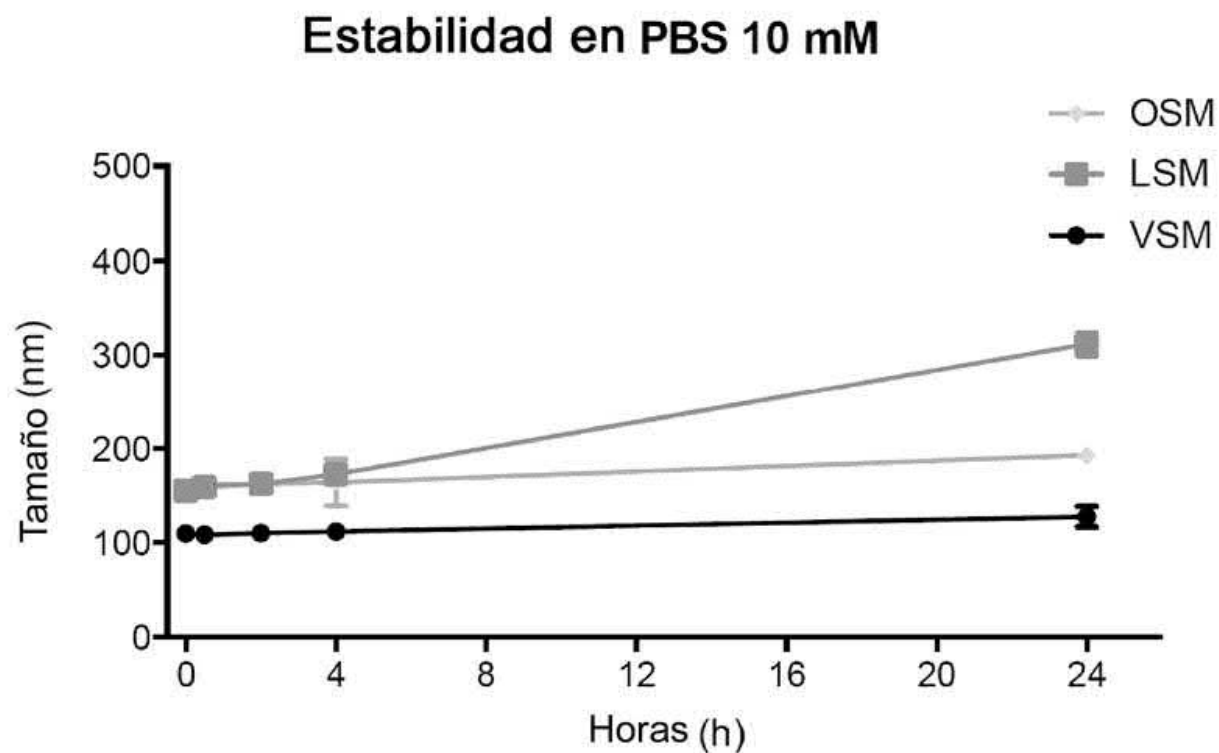


Fig. 17

