

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 965**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/50**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2019 PCT/EP2019/068629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20011896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2019 E 19736745 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024 EP 3820455**

54 Título: **Sistemas lipídicos nanoestructurados**

30 Prioridad:

**10.07.2018 EP 18382513**

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

**28.10.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (33.3%)  
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida  
15782 Santiago de Compostela, ES;  
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
(FIDIS) (33.3%) y  
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ GONZÁLEZ, JOSÉ VÍCTOR;  
OTERO ESPINAR, FRANCISCO JAVIER;  
COUCE PICO, M<sup>a</sup> LUZ;  
LUZARDO ÁLVAREZ, ASTERIA;  
COLÓN MEJERAS, CRISTOBAL y  
LEIS TRABAZO, M<sup>a</sup> ROSAURA**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 983 965 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

Sistemas lipídicos nanoestructurados

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a sistemas de administración de enzimas u otras proteínas, preferiblemente para su uso en las terapias de reemplazo enzimático (ERT), en particular para el tratamiento de enfermedades lisosomales. En particular, la invención abarca la preparación de una composición basada en sistemas lipídicos nanoestructurados y su uso en la fabricación de un producto terapéutico.

**Antecedentes de la invención**

Las enfermedades por almacenamiento lisosomal son un grupo de aproximadamente 70 trastornos hereditarios asociados con deficiencias en las enzimas lisosomales y todavía es un grave problema médico, social y sanitario. Se producen por el déficit de enzimas específicas intralisosomales o enzimas implicadas en el transporte de proteínas desde el núcleo hasta el citoplasma, encargadas de la hidrólisis ácida de macromoléculas dentro de los lisosomas. Esta deficiencia enzimática produce una acumulación progresiva del sustrato de la enzima a nivel celular en diferentes tejidos del organismo, lo que conduce a una enfermedad crónica y multiorgánica. Existen diferentes tipos de enfermedades lisosomales dependiendo de las macromoléculas que se acumulan a nivel intracelular.

El tratamiento de enfermedades lisosomales ha mejorado en los últimos años gracias al desarrollo de las terapias de reemplazo enzimático ("ERT"). Actualmente existen unas pocas enzimas recombinantes que pueden usarse en las ERT para diversas enfermedades. Las enfermedades lisosomales que se tratan con reemplazo enzimático incluyen:

- MPS-I (enfermedad de Hurler, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Scheie), cuyo tratamiento es la laronidasa [Aldurazyme®].
- MPS-II (enfermedad de Hunter) que se trata con idursulfasa [Elapraxe®].
- MPS IV-A (enfermedad de Morquio A) que se trata con la elosulfasa alfa.
- MPS VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) cuyo tratamiento es la galsulfasa [Naglazyme®].
- MPS VII (síndrome de Sly) cuyo tratamiento es la vestronidasa alfa [Mepsevii®].
- Enfermedad de Gaucher tratada con la imiglucerasa [Cerezyme®] o con velaglucerasa alfa (Vpriv®).
- Enfermedad de Fabry tratada con agalsidasa beta [Fabrazyme®] o agalsidasa alfa [Replagal®].
- Enfermedad de Pompe tratada con alglucosidasa alfa [Myozyme®].
- Enfermedad de Batten cuyo tratamiento es cerliponasa alfa [Brinuera®].
- Enfermedad de Wolman cuyo tratamiento es sebelipasa alfa [Kanura®].
- Alfa-manosidosis tratada con velmanasa [Lamzede®].

La mayoría de los fármacos usados en ERT, se formulan como disolución en dispersión de la enzima en un entorno isotónico y estéril que va a administrarse por vía endovenosa a los pacientes y va a proporcionar las proteínas que los pacientes son incapaces de sintetizar por sí mismos. Este sistema tiene la desventaja de que, para alcanzar las concentraciones eficaces a nivel lisosomal, es necesario infundir disoluciones con concentraciones de enzima elevadas lentamente, durante al menos 3-4 horas para garantizar la acumulación de enzimas en el interior de los lisosomas. El tratamiento debe repetirse en periodos de tiempo relativamente cortos (por ejemplo, semanalmente) debido a la biodistribución ineficiente de estas proteínas y a su rápida biodegradación y eliminación. Para garantizar su acumulación en lisosomas, las enzimas deben modificarse incluyendo ligandos específicos de transportador de membrana, que median la internalización y acumulación de proteínas en los lisosomas. Sin embargo, su uso está asociado con algunos efectos adversos. La mayoría de los tratamientos basados en ERT pueden producir durante esta administración o en las horas posteriores al tratamiento, trastornos relacionados con reacciones de hipersensibilidad y anafilácticas provocados por los elevados niveles de enzima en el torrente circulatorio. Como en otras terapias enzimáticas, los pacientes desarrollan al cabo del tiempo anticuerpos de tipo IgG, lo que está relacionado con problemas inmunitarios. Además, las enzimas presentan valores de aclaramiento plasmático relativamente elevados con semivida plasmática pequeña que provoca la eliminación rápido una vez que se interrumpe la administración. Este hecho significa que la administración debe repetirse durante periodos de tiempo relativamente cortos. Debido al especial estado de debilidad de los pacientes con enfermedades por

almacenamiento lisosomal, cualquier efecto secundario puede llegar a ser muy importante. Por tanto, es crucial realizar la administración de enzimas en condiciones estrictas. Aunque en algunas terapias de reemplazo enzimático es posible administrar la enzima en el domicilio del paciente con enfermera desplazada, la importancia de los efectos secundarios asociados al tratamiento ha limitado en una parte importante esta posibilidad.

Por tanto, los tratamientos con ERT actuales de enfermedades lisosomales consisten en la administración intravenosa mediante infusión continua de la enzima deficitaria con el fin de alcanzar los niveles intracelulares necesarios para eliminar los depósitos acumulados. Sin embargo, para alcanzar la concentración terapéutica de enzimas en el interior de las células, es necesario prolongar la administración de disoluciones de enzimas altamente concentradas durante periodos prolongados de tiempo. El uso de estas concentraciones favorece la aparición de problemas de sensibilización lo que limita seriamente este tipo de tratamiento. Adicionalmente algunas de las enfermedades por almacenamiento lisosomal (MPSI, MPSII, MPSIII A y B, leucodistrofia metacromática o lipofuscinosis neuronal ceroida (nlcs)) tienen asociado un componente neurológico importante debido al hecho que para obtener eficacia del tratamiento es necesario que la enzima alcance el sistema nervioso central. Puesto que las enzimas no son capaces de cruzar la barrera encefálica y este objetivo no se logra mediante infusión intravenosa en este caso es necesario usar la administración intratecal o intracerebroventricular. Para facilitar la administración es posible implantar un infusor o puerta de bomba en los pacientes. El documento US4241046 divulga vesículas bicapa lipídicas para la encapsulación de enzimas en terapia de reemplazo enzimático.

Por estos motivos y para evitar estos inconvenientes es necesario desarrollar nuevas estrategias para proteger la enzima y optimizar los sistemas de administración de fármacos enzimáticos. La presente invención se desarrolló con este objetivo.

#### Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un sistema farmacéutico lipídico nanoestructurado (de aquí en adelante denominado: "sistema lipídico nanoestructurado de la invención" o "composición de la invención"), preferiblemente para su uso en ERT, como vehículo para transportar enzimas u otras proteínas, que permite mejorar la distribución, estabilidad y la disponibilidad de la proteína a nivel celular, permitiendo la liberación de proteína durante periodos de tiempo más prolongados y alcanzar tejidos diana importantes, tales como el tejido cerebral, musculo esquelético, huesos y cartílagos. En el caso concreto de ERT, la composición de la invención aumenta la estabilidad de la enzima en plasma, promoviendo la internalización intracelular del portador nanoestructurado del sistema lipídico a niveles lisosomales en donde se libera la enzima progresivamente. La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1 Ejemplo de la distribución de tamaños de los portadores lipídicos nanoestructurados (NLC), determinada mediante DLS.

Figura 2 Ejemplo del tamaño de partícula antes y después de la liofilización y la reconstitución de las formulaciones.

Figura 3 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los portadores lipídicos nanoestructurados en el que se observa la morfología externa (izquierda) y la estructura interna de los NLC que contienen la enzima (derecha)

Figura 4 Actividad enzimática antes y después de la rotura, liberación por enzimas y recuperación de los NLC.

Figura 5 Tamaño de partícula de los NLC y actividad enzimática de los NLC que contienen elosulfasa alfa tras diferentes tiempos de incubación en plasma humano. Los gráficos muestran la estabilidad de la enzima y de los NLC en presencia de plasma.

Figura 6 Electroforesis en gel de acrilamida: carril 1- tamaños moleculares convencionales. Carril 2 - enzima libre (elosulfasa alfa (GALNS)). Carril 3 - extracto proteico de células de condrocitos sin tratar (línea celular Street TC28a2). Carriles 4-5-6-7-8: diferentes muestras de extractos proteicos de células incubadas con diversos NLC con elosulfasa alfa inmovilizada. En todas ellas se aprecia la banda proteica que aparece en el carril 2 correspondiente a la elosulfasa alfa con la excepción del carril 3 en el que se incluyen las células sin tratar.

Figura 7 Actividad enzimática (galactosa 6-sulfato-sulfatasa y su enzima recombinante elosulfasa alfa) encontrada en condrocitos de la línea celular TC28a2, después de la incubación con la enzima inmovilizada en NLC y en su comparación con la actividad basal.

Figura 8 Resultados del estudio de internalización en condrocitos mediante microscopia confocal. En las fotografías pueden apreciarse puntos de color rojo (NLC) dentro de las células (teñidas en verde). (A) imágenes tras la incubación de las células con NLC durante 1 hora a 37 °C. B) 2 horas de incubación a 37 °C y C) 1 hora de incubación a 4 °C.

- 5      Figura 9 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de condrocitos incubados con los NLC que contienen elosulfasa alfa después de 1 hora de incubación a 37 °C. Se observa la formación de invaginaciones típicas asociadas con procesos de pinocitosis y fagocitosis en la superficie de los condrocitos; (B) Se observan NLC en el interior de las células tras su internalización mediante estos mecanismos; C y D) Se observa la internalización de los NLC mediante mecanismos asociados con la endocitosis.
- 10     Figura 10 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los condrocitos incubados con los NLC que contienen elosulfasa alfa después de 1 hora de incubación a 37 °C. En las figuras A y B se observa la formación de vesículas en el interior de la célula como consecuencia de la internalización de los NLC, en la C, la fusión con lisosomas y en la D y E los NLC en el interior de los lisosomas después de 3 y 6 horas de incubación.
- 15     Figura 11 Imagen de microscopía electrónica de transmisión de los cartílagos sin tratamiento e incubados con los NLC que contienen elosulfasa alfa después de 3, 4 y 6 horas de incubación a 37 °C. Estas imágenes corresponden a células que forman parte del tejido cartilaginoso. En las imágenes de muestras sin tratar se observa un macrófago que contiene varios depósitos de GAG en el interior (gris claro, flecha) y en las muestras tratadas incorporándose observa la internalización de los NLC en depósitos de GAG que aumentan de tamaño y tornan a color negro como consecuencia de la acumulación de lípidos.
- 20     Figura 12 Comparación de la cantidad de proteínas relacionadas con los procesos de síntesis, catabolización y metabolización del queratán sulfato expresadas en las células de los cartílagos a diferentes tiempos. El queratán sulfato es un glucosaminoglicano relacionado con la enfermedad de Morquio. La figura muestra que el tratamiento con la enzima inmovilizada en NLC produce una mayor expresión de proteínas que la elosulfasa alfa libre, pese a estar la enzima en una concentración 2000 veces menor en los NLC.
- 25     Figura 13 Diagramas de Venn que identifican la expresión de proteínas comunes entre los tejidos de los dos donantes tratados a diferentes tiempos con la elosulfasa alfa inmovilizada. Estos diagramas identifican procesos comunes para analizar los cambios producidos por el mismo tratamiento en ambos tejidos.
- 30     Figura 14 Esta figura representa la expresión de proteínas (%) a diferentes tiempos de los procesos biológicos implicados en la biosíntesis, el catabolismo y procesos metabólicos de glucosaminoglicanos y del metabolismo del queratán sulfato. Se observa en todos los casos y para todos los tiempos investigados una mayor expresión de proteínas en tejidos incubados con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC pese a que la concentración de enzima es 2000 veces menor que la de la disolución de enzima libre.
- 35     Figura 15 Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de muestras de tejido procedente de amígdala de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Morquio A. Las imágenes muestran macrófagos con depósitos esféricos de color gris de queratán sulfato, que son característicos de la enfermedad.
- 40     Figura 16 Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de muestras de tejido procedente de amígdala de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Morquio A después de una hora (fotografía superior izquierda) y dos horas (resto de imágenes) de incubación con NLC que contienen elosulfasa alfa inmovilizada. Se observa como de forma progresiva los depósitos de queratán sulfato cambian a color negro y aumentan de tamaño, como consecuencia de la acumulación de NLC en los lisosomas.
- 45     Figura 17 Relación entre la actividad enzimática de las células no tratadas y las células incubadas con los NLC que contienen elosulfasa alfa. Se observa un aumento significativo en la actividad enzimática celular después de la incubación con el fármaco inmovilizado en los NLC.
- 50     Figura 18 Imágenes de microscopia confocal de fluorescencia de muestras del cerebro de ratón 24 horas después de la administración intravenosa de los NCL. Las imágenes están tomadas a diferentes aumentos.
- 55     Figura 19 Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de muestras de tejido cerebral procedente de ratones sacrificados 24 horas después de la administración de NLC mediante inyección intravenosa. La imagen muestra una sección del epitelio que forma parte de la barrera hematoencefálica y también se aprecian varios NLC que se difunden a través de la misma.
- 60     Figura 20 Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de muestras de tejido cerebral procedente de ratones sacrificados 24 horas después de la administración de NLC mediante inyección intravenosa. En la imagen se muestran astrocitos que contienen en su interior varios NLC.
- 65     Figura 21 Microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión de muestras de tejido cerebral procedente de ratones sacrificados 24 horas después de la administración de NLC mediante inyección intravenosa. En la imagen pueden observarse varios NLC localizados en el citoplasma de neuronas.
- Figura 22. Imágenes de microscopia confocal de fluorescencia de muestras de tejido de ratón 24 horas después de

la administración intravenosa de los NLC a ratones. Las imágenes A, B y C: corresponden a muestras de pulmón a diferentes aumentos (X10, X40 y C B X63). D, E y F: corresponden al hígado (D X10, X40 y F X100). Las imágenes G, H, I correspondientes a tejido muscular (G X10, H X40 y I X63).

5 Figura 23 Curvas de DSC de muestras de lípidos sólidos.

Figura 24 Curvas de DSC de algunas mezclas de lípidos sólidos y lípidos líquidos usados en la elaboración de los NLC. Las mezclas incluyen trimiristina (Dynasan 114), triestearina (Dynasan 118) behenato de glicerilo (Compritol ATO 888), triglicéridos del ácido cáprico y caprílico (Miglyol 812), colesterol y aceite de oliva.

10 Figura 25. Curvas de DSC del behenato de glicerilo (Compritol ATO 888), trimiristina (Dynasan 114) y su mezcla 1:1 (P/P).

15 Figura 26 Curvas de DSC de aceite de oliva, de los triglicéridos de ácido cáprico y caprílico (Miglyol 812) y sus mezclas (M4)

Figura 27 Curvas de DSC de las mezclas M1 y M6. Ambas tienen la misma composición salvo que la M1 incluye también colesterol en la mezcla.

20 Figura 28 Difractogramas de rayos X de algunos de los lípidos sólidos usados en la invención.

Figura 29 Difractogramas de rayos X de la mezcla M5 que contiene behenato de glicerilo y trimiristina en una razón 1:1 (p:p).

25 Figura 30 Difractogramas de rayos X de las mezclas M1, M2, M3 y M6 que contienen diferentes lípidos sólidos y lípidos líquidos.

30 Figura 31. Esta figura representa la expresión de proteínas (% p/p) de muestras de tejido cartilaginoso de donantes sanos de los principales procesos biológicos relacionados con el desarrollo y crecimiento del cartílago. Se observa en todos los casos y para todos los tiempos una mayor expresión de proteínas en tejidos incubados con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC pese a que la concentración de enzima es 2000 veces menor que la disolución de enzima libre.

35 Figura 32. Esta figura representa la expresión de proteínas (% p/p) de muestras de tejido cartilaginoso de donantes sanos de los principales procesos biológicos relacionados con el desarrollo y crecimiento de la matriz extracelular. Se observa en todos los casos y para todos los tiempos investigados una mayor expresión de proteínas en tejidos incubados con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC pese a que la concentración de enzima es 2000 veces menor que la disolución de enzima libre.

40 Figura 33. Esta figura representa la expresión de proteínas (% p/p) de muestras de tejido cartilaginoso de donantes sanos de los principales procesos biológicos relacionados con el desarrollo y crecimiento del colágeno. Se observa en todos los casos y para todos los tiempos investigados una mayor expresión de proteínas en tejidos incubados con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC pese que la concentración de enzima es 2000 veces menor que la disolución de enzima libre.

45 Figura 34. Imágenes de inmunohistoquímica mediante el ensayo funcional de una proteína, Lumican, relacionada con el desarrollo de las fibras de colágeno, en muestras de fibroblastos procedentes de donantes sanos y de pacientes con Morquio A. Las imágenes incluyen células tratadas con elosulfasa alfa libre o inmovilizada en NLC. Se observa un aumento en la expresión de Lumican en ambos casos.

50 Figura 35. Comparación de interacciones proteicas de tejido cartilaginoso sano no tratado con cartílago tratado mediante 24 h de incubación con NLC cargado con elosulfasa alfa.

55 Figura 36. Microscopía de fluorescencia confocal que muestra (en rojo) la presencia de formulaciones de NLC en diferentes órganos y tejidos después de 24 h de administración subcutánea. a) cerebro, b) pulmón, c) costillas, d) hígado, e) bazo, f) riñón, g) músculo esquelético y h) hueso.

60 Figura 37. Estas figuras muestran que la elosulfasa alfa encapsulada ayuda a regenerar cartílago y hueso, en particular, estas figuras ilustran estudios de proteínas realizadas en cartílago de pacientes sanos y células patológicas de fibroblastos que encuentran similitud de proteínas en las diferentes células para estas funciones.

Figura 38. Ruta metabólica donde la regeneración de la ruta puede observarse una vez que los NLC se incorporan con elosulfasa alfa (imagen anterior sin tratamiento, imagen posterior con tratamiento con NLC + elosulfasa alfa).

**Descripción detallada de la invención**

El tratamiento actual de enfermedades lisosomales consiste en la administración intravenosa, mediante infusión continua, de la enzima deficitaria con el fin de alcanzar los niveles intracelulares necesarios para eliminar los depósitos acumulados de material. Sin embargo, debido a su naturaleza proteica, las enzimas se distribuyen de manera deficiente en el interior de tejidos celulares. Por tanto, se requiere la infusión repetida de una disolución de enzima altamente concentrada. El uso de estas concentraciones favorece los problemas de sensibilización lo que limita este tipo de tratamiento. Adicionalmente, no es posible alcanzar concentraciones eficaces a nivel del sistema nervioso central mediante la administración intravenosa, por tanto, se requiere reemplazar la administración de enzimas por administración vía intratecal o intracerebroventricular.

La presente invención proporciona así un sistema farmacéutico lipídico nanoestructurado, preferiblemente para su uso en ERT, como vehículo para transportar enzimas u otras proteínas y que permite mejorar su distribución, estabilidad y la disponibilidad a nivel celular, permitiendo además la liberación de proteínas durante periodos de tiempo más prolongados y alcanzando una mejor distribución en tejidos diana, tales como el tejido cerebral, músculo esquelético, huesos y cartílagos. La composición de la invención aumenta la estabilidad en plasma de las proteínas, preferiblemente las enzimas, y favorece su internalización a nivel celular a través de la internalización intracelular del sistema lisosomal del portador lipídico nanoparticulado con la enzima inmovilizada que se libera progresivamente a este nivel.

La presente invención se refiere a un NLC (sistema lipídico nanoestructurado), en la que el NLC comprende:

a. un núcleo gelificado que comprende una disolución, solución o dispersión acuosa que comprende un polímero sensible a la temperatura que se convierte en gel en función de la temperatura y que comprende además una o más enzimas, preferiblemente enzimas lisosomales, u otras proteínas con actividad en el metabolismo celular, inmovilizadas en el núcleo;

ratura y que comprende además una o más enzimas, preferiblemente enzimas lisosomales, u otras proteínas con actividad en el metabolismo celular, inmovilizadas en el núcleo;

b. una capa lipídica que recubre el núcleo interior que comprende una mezcla de:

i. un lípido sólido o sólido o ceroso a temperatura ambiente, es decir, 25 °C a 101,3 kPa, que comprende ácidos grasos, preferiblemente de cadena larga, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas por encima de los 35 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), con un valor de HLB inferior a 10 y densidades entre 0,8 y 1 g/cm<sup>3</sup>, o una mezcla de tales lípidos sólidos, y

ii. un lípido que se comporta como líquido a temperatura ambiente, constituido por ácidos grasos, preferiblemente de cadena corta, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas inferiores a los 30 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), y densidades que oscilan desde 0,88 hasta 0,97 g/cm<sup>3</sup>, en el que la mezcla de lípidos líquidos y sólidos presenta un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas entre 20 °C y por debajo de 50 °C, determinadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), en el que la mezcla de lípidos líquidos y sólidos, se mezclan en una razón (lípido líquido:lípido sólido) de 98:2 a 1:99 %, en el que tales razones se expresan como porcentaje en peso de lípidos líquidos y sólidos con respecto a la composición lipídica total de la capa lipídica que recubre el núcleo interior; en el que tal capa lipídica también comprende tensioactivos solubles o dispersables en lípidos; en el que tales tensioactivos solubles o dispersables en lípidos, se seleccionan de entre moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a 10; y

c. un recubrimiento pegilado de la capa lipídica que también comprende tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua, en el que dicho recubrimiento pegilado comprende polietilenglicol o ésteres de PEG y los tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua tienen un HLB superior a 10. Pueden estar comprendidas las siguientes realizaciones:

(i) Una o varias enzimas lisosomales o proteínas con actividad sobre el metabolismo celular tales como infliximab, abatacept, rituximab, adalidumab, etanercept, golimumab, certolizumab, sifalimumab, anifrolumab o proteínas similares. Las enzimas lisosomales incorporadas en la formulación serían cualquiera de las empleadas en el tratamiento de enfermedades lisosomales o deficiencias similares, tales como elosulfasa alfa, laronidasa, idursulfasa, galsulfasa, imiglucerasa, agalsidasa, alglucosidasa o N-acetil glucosaminidasa. Las proteínas se inmovilizan en el núcleo gelificado;

(ii) Un núcleo acuoso que se gelifique. El núcleo está formado por una disolución, solución o dispersión de naturaleza acuosa que puede incluir: agua, disolución tampón de pH, sales, así como un polímero sensible a la temperatura que gelifique en función de la temperatura o de la concentración iónica: es decir, poloxámero 407 (se hace notar que la denominación poloxámero incluye polímeros de tribloque con una cadena central hidrofóbica de poli(óxido de propileno) y dos cadenas laterales de polioxietileno en diferentes proporciones. Ejemplo: P407 está formado por una cadena de polioxipropileno de 4000 Da y un contenido de polioxietileno del 70 %); Adicionalmente al poloxámero 407, otros posibles agentes gelificantes útiles en la presente invención pueden seleccionarse de la lista que consiste en: quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el copolímero de

dibloque de polietilenglicol y poli(ácido láctico) (PEG-PLGA-PEG);

(iii) Una capa lipídica que recubre el núcleo acuoso formada por mezclas de lípidos sólidos y líquidos. Lípidos sólidos tales como ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres, tales como el ácido esteárico, ácido palmítico, behénico, araquídico palmítico, estearato de glicerilo, dibehenato de glicerilo, palmitato de cetilo, gliceriltrimiristina, triestearato de tripalmitina; fosfolípidos tales como fosfoglicéridos y esfingolípidos; ácidos y sales biliares tales como taurocolato, desoxicolato, glicocolato, hidodesoxicolato, litocolato y similares. Lípidos líquidos tales como: ácidos grasos de cadena corta y media y sus ésteres, tales como ácido valérico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, pelargónico, enántico, así como triglicéridos de ácido caproico, cáprico, caprílico, o lauroil-polioxiglicéridos; tocoferol u otros derivados de la vitamina E; así como aceites naturales de origen vegetal o animal como aceite de oliva, maíz, sésamo, algodón, soja, girasol, coco, o hígado de bacalao;

(iv) Tensioactivos y estabilizantes. Tensioactivos y estabilizantes como lecitinas (por ejemplo, soja, huevo, maíz, girasol ...), poloxámeros (188, 407), ésteres de polietilenglicol o polietileno (hidroxiestearatos de macrogol, estearato de polietileno ...), aceite de ricino de polioxietilo, y ésteres de polisorbato con ácidos grasos (polisorbato 20, 65, 40,60, 80); y

(v) Agentes modificadores de la superficie para evitar la opsonización del NLC y modificar la biodistribución. Incluyen agentes pegilantes como los polietilenglicoles de diversos pesos moleculares, los derivados de la vitamina D sustituidos como el tocoferol-succinato-PEG 1000, coloides hidrófilos tales como polímeros hidrófilos de poli(alcohol vinílico), polisacáridos tales como quitosano, pectinas ..., o péptidos.

El sistema lipídico nanoestructurado de la presente invención puede prepararse según el siguiente protocolo: en una primera etapa A, se añade una disolución, solución o dispersión acuosa que incluya un polímero termogelificante como poloxámero 407 o un polímero sensible a la temperatura y opcionalmente comprenda una o varias enzimas lisosomales u otras proteínas, a una fase oleosa que comprenda una mezcla de lípidos sólidos y líquidos y disolventes, de manera que se forme una capa superior (fase oleosa) y una capa inferior (fase acuosa); es importante aclarar que una vez se forma la emulsión, la disolución o dispersión acuosa constituye la fase dispersa y la mezcla de lípidos sólidos y líquidos con los disolventes la fase continua o dispersante. (B) en una segunda etapa se formará una emulsión primaria, esta emulsión puede producirse por ejemplo usando homogeneización ultrasónica. (C) Una vez que se forma la emulsión primaria, la fase dispersa (formada por gotículas a partir de la disolución o dispersión acuosa) se cambia químicamente a partículas o gotículas de gel a medida que se aumenta la temperatura o la concentración iónica. (D) Al sistema de gel en aceite resultante de la etapa (C) se le añade una nueva fase acuosa externa que comprenda componentes para modificar las propiedades superficiales para minimizar la opsonización de las nanopartículas y modificar su biodistribución. Esta nueva fase acuosa incluye componentes pegilantes como polietilenglicoles de diversos pesos moleculares, derivados de la vitamina D como tocoferol-succinato-PEG 1000, coloides hidrófilos (polímeros hidrófilos naturales como poli(alcohol vinílico)...) o péptidos. Una vez añadida la nueva fase acuosa, se obtiene la emulsión secundaria por ejemplo mediante homogeneización ultrasónica, dando lugar a un sistema sólido de gel en aceite en agua. (E) posteriormente se solidifican los lípidos mediante la adición del sistema resultante de la etapa (D) a una dispersión acuosa de tensioactivos con HLB superior a 10, preferiblemente en baño de hielo. En esta etapa los lípidos se solidifican y depositan en la superficie de las partículas de gel formándose los sistemas nanoestructurados. Es importante aclarar que, en esta emulsión secundaria, la nueva disolución o dispersión acuosa constituye la fase continua o dispersante y las gotículas de gel cubiertas por la mezcla de lípidos sólidos y líquidos la fase dispersa.

Adicionalmente, se hace notar que el sistema lipídico nanoestructurado puede obtenerse en forma de sólido pulverulento que puede reconstituirse fácilmente en un vehículo acuoso, dando lugar a una dispersión homogénea de los NLC con características adecuadas para su administración intravenosa. Para obtener el sólido pulverulento, pueden usarse técnicas de secado tales como liofilización o secado por pulverización. En el caso de la liofilización, para evitar la agregación del NLC que impedirían la correcta redispersión es necesario añadir agentes crioprotectores. Entre otros, los agentes crioprotectores que pueden utilizarse incluyen sacarosa, glucosa, maltosa, trehalosa, sorbitol, ciclodextrinas y glicerina entre otros. Para liofilizar, se congela el NLC que contiene agentes crioprotectores, preferiblemente de manera rápida, para a continuación eliminar el agua mediante liofilización.

En base a la metodología descrita anteriormente, se desarrolló el primer sistema lipídico que proporciona nanopartículas sólidas lipídicas y la primera etapa era inmovilizar la enzima elosulfasa alfa, una enzima útil para tratar la enfermedad de Morquio. Para la preparación de las nanopartículas cargadas con la enzima elosulfasa alfa, se utilizaron los siguientes componentes: poloxámero 407 como agente para preparar el núcleo acuoso gelificado; diclorometano que contiene ácido esteárico y fosfatidilcolina (lecitina de soja) como fase externa de la primera emulsión (es decir, como capa de recubrimiento lipídica del núcleo acuoso gelificado), y Solutol HS15 al 2 % (éster de poliglicol de ácido 12-hidroxi esteárico) en la fase externa de la emulsión múltiple para completar las etapas D y E.

Como resultado de este enfoque se obtuvieron nanopartículas sólidas lipídicas con tamaños entre 170-800 nm y con carga enzimática variable. Los principales inconvenientes observados fueron la baja capacidad de inmovilización enzimática de las nanopartículas y la escasa estabilidad de las formulaciones ya que las partículas se agregaban

rápidamente después de su preparación.

Con la finalidad de estabilizarlas y mejorar la tasa de inmovilización enzimática se elaboraron diferentes formulaciones que incorporaban tensioactivos en la fase acuosa final tales como Tween 80, taurocolato de sodio, colato de sodio o lecitina de soja o polímeros tales como PEG 300, 400 y 6000. Este enfoque se llevó a cabo con el propósito de recubrir las partículas con una capa hidrófila de PEG (polietilenglicol) que mejora la estabilidad y previene fenómenos tales como la opsonización de las nanopartículas *in vivo*. Con este propósito se sometió a ensayo también la incorporación de D- $\alpha$  tocoferol ácido polietilenglicol 1000 succinato en la segunda fase acuosa. Los radicales lipófilos de este compuesto favorecen la interacción con los lípidos por lo que se mejora mucho la pegilación de la superficie de las partículas.

Pese a estas modificaciones, las nanopartículas sólidas lipídicas se desestabilizaron al poco tiempo de su fabricación, sufriendo procedimientos de aglomeración y observándose también un aumento en el tamaño a lo largo del tiempo. Después de analizar los resultados, se llegó a la conclusión de que la inestabilidad estaba asociada a la utilización del ácido esteárico como único componente lipídico. El ácido esteárico es un producto sólido cristalino a temperatura ambiente, con una temperatura de fusión de 69 °C. el ácido esteárico se cristaliza a lo largo del tiempo, dando lugar a nanopartículas rígidas inestables. Por ello se decidió sustituir parcial o totalmente la composición de la fase lipídica para obtener sistemas lipídicos nanoestructurados más estables que las nanopartículas sólidas lipídicas y para aumentar la carga enzimática.

Con este objetivo, se realizaron varias pruebas incorporando diferentes componentes lipídicos: triglicéridos de los ácidos grasos de cadena media caprílico y cáprico, colesterol, trimiristina microcristalina o trimiristato de glicerilo, triestearina o triestearato de glicerol microcristalino, behenato de glicerilo, así como diferentes aceites vegetales tales como aceite de coco, algodón o aceite de oliva. También se sometieron a ensayo diferentes condiciones de síntesis, modificando la intensidad y tiempo de la etapa de homogenización por ultrasonidos, así como los intervalos de temperatura en las diferentes etapas del procedimiento. Después de todo, se estableció la formulación definitiva de la siguiente manera: elosulfasa alfa inmovilizada en un núcleo interior gelificado basado en un polímero (poloxámero 407) que gelifica en función de la temperatura; un recubrimiento lipídico del núcleo acuoso gelificado formada por mezclas de los siguientes lípidos sólidos y líquidos: behenato de glicerilo, trimiristato de glicerilo, triestearina, colesterol, aceite de oliva virgen, triglicéridos de los ácidos grasos de cadena media cáprico y caprílico y lecitina de soja líquida; D- $\alpha$  tocoferol ácido polietilenglicol 1000 succinato para la pegilación de la superficie de las partículas; y poloxámero 188 como tensioactivo, y añadidos a una temperatura que permita forzar la solidificación de los lípidos mediante choque térmico provocado por el descenso brusco de temperatura.

Con esta formulación los investigadores llevaron a cabo con éxito estudios de internalización celular y captación de NLC en los lisosomas de muestras de tejidos sanos y enfermos. Se determinó además la expresión de las proteínas involucradas en los procesos biológicos del metabolismo de glucosaminoglicanos y en particular de las proteínas involucradas con el queratán sulfato e involucradas en procesos biológicos relacionados con el desarrollo de la enfermedad (síntesis de matriz extracelular, colágeno, cartílago y hueso). La estabilidad en plasma de la enzima inmovilizada en los NLC se estudió para determinar el nivel de protección frente a proteasas. Finalmente se estudió la biodistribución *in vivo* de los NLC en órganos y tejidos en animales de experimentación después de su administración intravenosa.

Con el objetivo de demostrar que la presente invención no se restringe únicamente a una única formulación, después de eso se ha demostrado que la obtención de nuevos sistemas lipídicos nanoestructurados estables a partir de la sustitución selectiva de algunos de los componentes existentes en la formulación mencionada anteriormente.

Componente sustituido	Componente añadido	Tamaño	Pdl	Potencial zeta	% de rendimiento o peso de formulación con respecto al peso inicial de sólidos	Enzima inmovilizada	Actividad enzimática en núcleo, ( $\mu\text{mol/l/h}$ )	Actividad enzimática en superficie, ( $\mu\text{mol/l/h}$ )
elosulfasa alfa	laronidasa	246,8	0,154	-14,4	56,352	laronidasa	3,6	108
elosulfasa alfa	laronidasa	227,3	0,118	-14,0	48,055	laronidasa	3,8	164,6
behenato de glicerilo	Diestearato de precirglicerilo	211,2	0,136	-14,8	53,209	laronidasa	5,6	163
Poloxámero 188	Gliceril capril o caproil macrogol-8 / polioxil-8	185,7	0,175	-11,2	23,209	laronidasa	1,4	171,8

Trimiristina microcristalina	triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	191,7	0,124	-14,8	41,154	laronidasa	2,4	29,8
Lecitina de soja líquida	Lecitina de huevo	195,8	0,102	-9,44	53,141	laronidasa	243	243
Aceite de oliva	Aceite de girasol	214,8	0,163	-14,9	44,703	laronidasa	3,6	84,4
Aceite de oliva	Aceite de hígado de bacalao	278,9	0,290	-11,9	27,736	laronidasa	2	200
Elosulfasa alfa	laronidasa	246,8	0,154	-14,4	56,352	laronidasa	3,6	108
Elosulfasa alfa	laronidasa	227,3	0,118	-14,0	48,055	laronidasa	3,8	164,6
Elosulfasa alfa	idursulfasa	194,7	0,163	-15,7	34,484	idursulfasa	816	640
Elosulfasa alfa	idursulfasa	206,5	0,138	-15,3	54,418	idursulfasa	742	448

Tal como se muestra en la tabla anterior, la enzima inmovilizada en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención puede reemplazarse con éxito por otras enzimas, tales como idursulfasa o laronidasa. Por tanto, el sistema lipídico nanoestructurado de la invención en ningún caso está limitado a inmovilizar la elosulfasa alfa para su uso en el tratamiento de Morquio A, sino que esta formulación también puede usarse en el tratamiento de otras enfermedades por almacenamiento lisosomal. Dependiendo de la enzima que se utilice para cargar los sistemas lipídicos nanoestructurados podrían tratarse otras enfermedades lisosomales. Ejemplos de enfermedades que podrían tratarse usando sistemas lipídicos nanoestructurados de la invención son: enfermedad de Hurler, enfermedad de Herler-Scheie, enfermedad de Scheie o enfermedad de Hunter.

Además, el sistema lipídico nanoestructurado de la invención no sólo sirve para tratar enfermedades lisosomales sino tal y como se ilustra en las figuras 31 a 35 y 37 a 38, dependiendo el tipo de proteína cargada, también es posible usarlo para tratar o prevenir problemas de degeneración del cartílago y hueso y, por tanto, para prevenir o tratar enfermedades tales como artrosis, artritis reumatoide, lupus eritematoso o en lesiones traumáticas. Las enzimas particularmente útiles para dicho tratamiento o prevención de la degeneración del cartílago en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención pueden seleccionarse de la lista que consiste en: laronidasa [Aldurazyme<sup>®</sup>], idursulfasa [Elapraxe<sup>®</sup>], elosulfasa alfa y alfa vestronidasa [Mepsevii<sup>®</sup>]. Las enzimas particularmente útiles para dicho tratamiento o prevención de la degeneración del hueso en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención, es elosulfasa alfa.

Por otro lado, en la tabla anterior se muestra cómo el aceite de oliva (que forma parte de los lípidos líquidos) es intercambiable por aceite de hígado de bacalao o por aceite de girasol, la lecitina de soja líquido puede sustituirse por lecitina de huevo, la trimiristina microcristalina puede sustituirse por mezclas de triglicéridos del ácido cáprico y caprílico, el poloxámero 188 puede sustituirse por glicérido de capril o caproil macrogol-8 / polioxil-8 y el behenato de glicerilo por diestearato de glicerilo.

Por tanto, resulta importante aclarar que el sistema lipídico nanoestructurado de la invención puede tener diferentes composiciones de la capa lipídica. Una capa lipídica, en el contexto de la presente invención, debe estar formada por una mezcla de lípidos líquidos y sólidos. La mezcla puede ser sencilla (un solo componente de cada clase, un líquido y un sólido) o compleja (varios componentes de cada categoría, líquidos y sólidos). En cualquier caso, resulta esencial o necesario poner juntos estos dos tipos de lípidos (líquido y sólido) para obtener una capa lipídica elástica y resistente. Si se utilizan sólo lípidos sólidos, tal como por ejemplo ácido esteárico, la capa es un recubrimiento demasiado rígido y los lípidos tienden a cristalizar desestabilizando el sistema lipídico nanoestructurado de la invención. Sin embargo, la incorporación de lípidos líquidos, que actúan a modo de plastificante, permite la formación de una capa más elástica y resistente. Por otra parte, si sólo se utilizan lípidos líquidos, la consistencia de la capa lipídica es muy baja conduciendo a la formación de una emulsión en lugar del sistema lipídico nanoestructurado de la invención.

En el contexto de la presente invención el término "lípidos sólidos" se refiere a: material lipídico sólido o ceroso a temperatura ambiente, es decir 25 °C a 101,3 kPa, compuesto por ácidos grasos, preferiblemente ácidos grasos de cadena larga, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) en temperaturas por encima de los 35 °C, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), preferiblemente por encima de 37 °C, más preferiblemente por encima de 40 °C, con un valor de HLB inferior a 10 y densidades entre 0,8 y 1 g/cm<sup>3</sup>. Ejemplos de lípidos sólidos son los ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres (ácido esteárico, ácido palmítico, araquídico, behénico, palmitoestearato de glicerilo, dibehenato de glicerilo, palmitato de cetilo, triestearato de glicerilo, trimiristina, tripalmitina) fosfolípidos, ácidos y sales biliares (por ejemplo, taurocolato, desoxicolato, glicocolato, hidodesoxicolato, glicocolato, litocolato y similares ...).

En el contexto de la presente invención el término "lípidos líquidos" se refiere a: material lipídico que se comporta como líquido a temperatura ambiente, compuesto por ácidos grasos, preferiblemente ácidos grasos de cadena corta, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas inferiores a 30 °C y densidades que oscilan desde 0,88 hasta 0,97 g/cm<sup>3</sup>. Algunos ejemplos son ácidos grasos de cadena corta y media y sus ésteres (por ejemplo, ácido valérico, caproico, caprílico, cáprico, láurico, pelargónico y enántico, lauroil-polioxicigliceridos o triglicéridos caprílicos...), tocoferol u otros derivados de la vitamina E, aceites naturales de origen vegetal o animal (oliva, soja, girasol, coco, algodón, sésamo, maíz, aceite de hígado de bacalao...).

Es importante hacer notar que de acuerdo con la nomenclatura recomendada por la IUPAC para el nombre abreviado de los ácidos grasos basados en la variante "n" se emplea la siguiente fórmula:

C:D n-x,

Donde: C: representa el número de átomos de carbono del ácido graso;

D: el número de dobles enlaces del ácido graso, donde se supone que los dobles enlaces están en posición cis (la más habitual en los ácidos grasos naturales);

n: la posición del doble enlace distal, donde n es el número total de carbonos y x un número que proporciona la posición. Se considera que en caso de enlaces químicos múltiples estos están separados por un grupo metileno.

Ejemplo:

Ácido esteárico: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>COOH; C18:0

Ácido oleico: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOH; 18:1n-9

Ácido araquidónico: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH=CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH; 20:4n-6

Por tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, y en una realización preferida de la invención, los lípidos sólidos de la presente invención son aquellos que cumplen los siguientes criterios

- a) ácidos grasos saturados que presentan valores de C≥12 y C<41 y D=0;
- b) ácidos grasos insaturados y poliinsaturados trans, C>17 y C<25, D≥1, x entre 1 y n-2;
- c) monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de C≥14 y C<41 y D=0 con sorbitano, polioxi-etileno, polioxi-etilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- d) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos saturados con C≥3 y C<41 y D=0;
- e) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos insaturados trans; o
- f) mezclas de los mismos

Por otro lado, de acuerdo con esta nomenclatura, y en otra realización preferida de la invención los lípidos líquidos son aquellos que cumplen los siguientes criterios

- a) ácidos grasos saturados que presentan valores de C≥ 3 y C≤11 y D=0;
- b) ácidos grasos insaturados y poliinsaturados cis con C≥ 3 y C≤23, D≥1, x entre 1 y n-2;
- c) monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de C≥ 3 y C<14 y D=0 con sorbitano, polioxi-etileno, polioxi-etilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- d) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos saturados con C<3 y D=0
- e) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos insaturados cis C≥ 3 y C≤23, D≥1, x entre 1 y n-2; o
- f) mezclas de los mismos

En el contexto de la presente invención el término "esteroides" se refiere a: esteroides formados por de 27 a 29 átomos de carbono. Su estructura química deriva del ciclo-pentanoperhidrofenantreno (esterano), una molécula de 17 carbonos formada por tres anillos hexagonales y uno pentagonal. El colesterol y las sales biliares se clasifican en el grupo de los esteroides, que se utilizan para dar consistencia a membranas y capas lipídicas y también como

tensioactivos naturales. Ejemplos de esteroides son colesterol, colato de sodio, taurocolato de sodio.

5 En el contexto de la presente invención el término “tensioactivos solubles en lípidos o tensioactivos dispersables en lípidos” se entiende: moléculas tensioactivas con valores de HLB bajo, inferiores a 10. Se utilizan tensioactivos dispersables en lípidos en la primera fase de preparación de NLC para preparar la emulsión primaria entre los componentes del núcleo acuoso y la capa lipídica. Estos tensioactivos se seleccionan puesto que estabilizan preferiblemente emulsiones de agua en aceite (W/O). Un ejemplo es la lecitina de soja sólida o la lecitina de huevo con un HLB de 9,5.

10 En el contexto de la presente invención el término “tensioactivos solubles o tensioactivos dispersables en agua” se entiende: moléculas tensioactivas con HLB superior a 10 que estabilizan emulsiones de fase interna oleosa y fase externa acuosa. Estos tensioactivos se utilizan en la última etapa de la elaboración del NLC, cuando forma la emulsión múltiple de W/O/W para producir el endurecimiento de la capa lipídica. Ejemplos de estos tensioactivos son los poloxámeros, los glicéridos C8-C10 de polietilenglicol, el polisorbato 80 o las propias sales biliares.

15 En el contexto de la presente invención el término “agentes pegilantes” se refiere a: polímeros derivados del etilenglicol, como los polietilenglicoles de diversos pesos moleculares, ésteres con ácidos grasos (por ejemplo (15)-hidroxiestearato de polietilenglicol) o con tocoferoles. Todos son tensioactivos, son dispersables en agua y tienen valores de HLB>10. Estos productos son capaces de acumularse en la superficie del NLC haciéndola más hidrófila. En el caso de los polímeros lineales de PEG (PEG 300, 400, 6000, 10000, etc.) se produce una adsorción en superficie y en el caso de los derivados esterificados tales como el tocoferol succinato-PEG 1000, el tocoferol se ancla en la capa lipídica, haciéndola más eficaz.

25 El término “nanopartícula” se refiere a una estructura con un tamaño de partícula promedio inferior a 1 µm, y generalmente comprendido entre 1 y 300 nm.

30 En la presente invención por sistema lipídico nanoestructurado se entiende un sistema de liberación constituido por nanopartículas o nanocápsulas preparadas a partir de, entre otros componentes, mezclas de lípidos sólidos y líquidos. Debido a la presencia del lípido líquido en la estructura, la red cristalina del lípido sólido se ve perturbada y, entonces, se reduce la cristalinidad.

35 Para estudiar las propiedades físicas de los procesos de fusión de las capas lipídicas que son útiles en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención, se prepararon diferentes mezclas (véase la tabla a continuación) entre lípido sólido (M5), lípidos líquidos (M4) y sólidos y líquidos (M1, M2, M3 y M6). Se empleó un tratamiento similar al que se someten a estos lípidos en la preparación del sistema lipídico nanoestructurado de la invención. Los lípidos se disolvieron en diclorometano y se evaporaron a 50 °C para eliminar el disolvente. Finalmente, las mezclas obtenidas se almacenaron 24 horas a 5 °C. Se realizó la misma operación con los lípidos sólidos puros.

40 Para determinar las propiedades de fusión de las mezclas de lípidos se empleó calorimetría diferencial de barrido (DSC, TA Discovery) sometiéndolas a un ciclo de enfriamiento inicial desde temperatura ambiente hasta 0 °C y uno posterior de calentamiento hasta 100 °C. Ambos a una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto.

M1		M2		M3		M4		M5		M6	
behenato de glicerilo	25 mg	behenato de glicerilo	75 mg					behenato de glicerilo	91,5 mg	behenato de glicerilo	37 mg
timiristina	25 mg			timiristina		37,5 mg		timiristina	91,5 mg	timiristina	25 mg
triestearina	25 mg			triestearina		37,5 mg				triestearina	25 mg
Colesterol	12 mg	Colesterol	12 mg	Colesterol		12 mg					
Aceite de oliva virgen	100 mg	Aceite de oliva virgen	100 mg	Aceite de oliva virgen		100 mg				Aceite de oliva virgen	100 mg

Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 m g			Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 m g						
--	--------------	--	--------------	--	--------------	--	--------------	--	--	--	--------------

La figura 23 muestra las curvas de DSC de los lípidos sólidos puros. Los lípidos sólidos presentan un pico claro y nítido con una temperatura de comienzo mayor de 50 °C. Las bandas nítidas y bien definidas de fusión son características de productos altamente cristalinos.

5 La DSC de las mezclas se muestran en la figura 24. En esta figura, se observa que la temperatura de fusión disminuye significativamente en comparación con los productos puros, las bandas de fusión son más anchas y el flujo de calor por gramo de sustancia es significativamente menor que en el caso de los productos puros. Estos cambios indican que los lípidos sólidos son cristalinos que las mezclas. De acuerdo con la bibliografía la trimiristina y la triestearina tienen una  $T_{\text{comienzo}} > 53$  °C y el behenato de glicerilo aproximadamente de 70 °C, valores que coinciden con los observados en la figura 21. La mezcla de trimiristina y behenato de glicerilo reduce la temperatura de fusión del último, pero continúa por encima de los 50 °C y con un alto grado de cristalinidad similar al de los productos puros (véase la figura 25).

15 Por otro lado, los lípidos líquidos no muestran ninguna transición (fusión) en el intervalo de temperatura estudiada indicando que se encuentran en fase líquida (véase la figura 26). En las mezclas, la presencia de lípidos líquidos disminuye significativamente la temperatura de fusión ( $T_{\text{comienzo}}$ ), encontrándose en torno al intervalo 20 °C-40 °C. Además, el flujo de calor (W/G) disminuye de manera significativa, indicando que las mezclas forman un producto menos cristalino que los lípidos sólidos. Por tanto, la adición de colesterol en las mezclas conduce a una disminución más importante de la temperatura de comienzo y del intervalo de fusión, así como de la cristalinidad, actuando como un plastificante (véase la figura 24). Por tanto, y de acuerdo con los resultados mostrados en las figuras 21 a 25, las composiciones de lípidos sometidos a prueba más adecuados para la elaboración del sistema lipídico nanoestructurado de la invención son mezclas que comienzan a fundirse a temperaturas entre los 20 y los 40 °C presentando menor cristalinidad que los lípidos sólidos. Los lípidos que comienzan a fundirse a partir de los 50 °C pueden proporcionar problemas de estabilidad. Para estos lípidos, las curvas de DSC también indican un mayor grado de cristalinidad que en las mezclas de lípidos sólidos y líquidos.

Además, para determinar la modificación de la cristalinidad de las composiciones de lípidos sometidos a prueba en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención en comparación con los lípidos sólidos se usó difracción de polvo cristalino. Un difractómetro Philips, manejado con una unidad de control "PW1710", una unidad de control de goniómetro vertical "PW1820 / 00" y un generador "Enraf Nonius FR590" que funciona a 40 Kv y 30 mA. Los rayos X se obtuvieron de un tubo de Cu sellado y un monocromador de grafito ( $\lambda$  ( $K\alpha_1$ ) = 1,5406 Å). Los patrones de XRD se obtuvieron dentro de un intervalo angular 2-50° con un paso de 0,02° y un tiempo a paso de 2 s. Las muestras se tomaron para obtener perfiles de pico óptimos para el análisis, así como para minimizar el efecto de la orientación preferida. Se depositaron sobre una base orientada a los cristales (placa de Si (511)) para evitar la dispersión causada por un soporte vítreo.

La figura 28 muestra el difractograma de rayos X de los productos puros. Los patrones indican la estructura cristalina del ácido esteárico y el behenato de glicerilo. En el caso de la trimiristina y triestearina microcristalina, presentan también fases cristalinas, aunque con picos menos marcados que en los casos anteriores. La figura 29 muestra el difractograma de rayos X de las mezclas de lípidos sólidos. El difractograma muestra una pérdida de cristalinidad cuando se disuelven las mezclas de ambos productos en diclorometano y se evapora el disolvente. El tratamiento parece que disminuye significativamente la cristalinidad de los productos puros, pero todavía puede observarse la fase cristalina. La figura 30 muestra el difractograma de rayos X de las mezclas de lípidos sólidos y líquidos. Los patrones de las mezclas coevaporadas de lípidos sólidos y líquidos indican un aumento de la fracción amorfa de las mezclas con la presencia de algún sólido cristalino. Las mezclas 1, 3 y 6 muestran una pequeña fracción de trimiristina cristalina y triestearina microcristalina y porciones muy pequeñas de behenato de glicerilo que permanece en fase cristalina y en la 2 se observa solo una pequeña banda de Behenato de glicerilo. El producto es más amorfo que los componentes puros.

Por tanto, de nuevo se concluye que las composiciones de lípidos sometidas a prueba que mejor funcionan en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención son las mezclas de lípidos sólidos y líquidos que producen un sistema de baja cristalinidad en comparación con los lípidos sólidos, pero con una adecuada consistencia como recubrimiento. La alta cristalinidad de los productos puros o de las mezclas de lípidos sólidos desestabilizaría el sistema lipídico nanoestructurado de la invención. Sin embargo, la presencia de lípidos líquidos, que actúan a modo de plastificante, permite que la cubierta sea más elástica y, por tanto, resistente.

En definitiva, el sistema lipídico nanoestructurado de la presente invención comprende nanopartículas de lípidos sólidos, cuya estructura y red cristalina se ve perturbada por la presencia de lípidos líquidos, que comprenden la siguiente configuración estructural:

5 a. Un núcleo, que comprende una disolución o dispersión acuosa, que está gelificado. El núcleo interior está formado por una disolución, solución o dispersión acuosa que puede incluir: agua, disolución tampón de pH, sales, así como un polímero termosensible o sensible a los iones que gelifique en función de la temperatura o de la concentración de iones. Preferiblemente, este polímero es poloxámero 407. Sin embargo, otros posibles agentes gelificantes útiles en la presente invención se seleccionan de la lista que consiste en: quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el copolímero de dibloque de polietilenglicol y poli(ácido láctico) (PEG-PLGA-PEG);

10 b. Un recubrimiento de capa lipídica formada por una mezcla de lípidos líquidos y sólidos. La mezcla puede ser sencilla (un solo componente de cada clase, un líquido y un lípido sólido) o compleja (varios componentes de cada clasificación). Es necesario poner juntos estos dos tipos de lípidos para obtener una capa lipídica elástica y resistente. Si se utilizan sólo lípidos sólidos, como por ejemplo el ácido esteárico, las cubiertas son demasiado rígidas y estos lípidos tienden a cristalizar desestabilizando el NLC. La presencia de los lípidos líquidos, que actúan a modo de plastificante, permite que la capa sea más elástica y por tanto resistente. Por otra parte, si sólo se utilizan lípidos líquidos, la consistencia de la cubierta es muy baja, produciendo una emulsión en lugar del NLC. Tal capa también comprende tensioactivos solubles o dispersables en lípidos, es decir, moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a 10. Se utilizan tensioactivos dispersables en lípidos en la primera fase de preparación del sistema lipídico nanoestructurado de la presente invención para obtener una emulsión primaria W/O que contiene el núcleo acuoso y los componentes de la capa lipídica. Se emplean estos tensioactivos ya que estabilizan preferiblemente emulsiones de agua en aceite (W/O). Un ejemplo son las lecitinas de soja o huevo con un HLB de 9,5; y

25 c. Una capa pegilada que recubre la capa lipídica. Puede utilizarse PEG, pero se prefieren los ésteres de PEG con otros componentes más hidrófobos, como el tocoferol succinato-PEG 1000 porque permite anclar el PEG a la capa lipídica aumentando su estabilidad. Esta capa además comprende tensioactivos solubles o dispersables en agua (HLB > 10). Se utilizan para estabilizar el sistema y favorecer la formación del NLC durante el enfriamiento de la disolución y contribuyen a la estabilidad del sistema final.

30 Por tanto, la invención, se refiere a un sistema lipídico nanoestructurado que comprende nanopartículas que a su vez comprenden:

a. Un núcleo gelificado, que comprende una disolución o dispersión acuosa que comprende un polímero que gelifica en función de la temperatura (polímero sensible a la temperatura);

35 b. Una capa lipídica que recubre el núcleo formado por o que comprende una mezcla de:

40 a) un lípido sólido o ceroso a temperatura ambiente, es decir, 25 °C a 101,3 kPa, compuesto por ácidos grasos, preferiblemente de cadena larga, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas por encima de los 35 °C, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), preferiblemente por encima de 37 °C, más preferiblemente por encima de los 40 °C, con un valor de HLB inferior a 10 y densidades entre 0,8 y 1 g/cm<sup>3</sup>, o una mezcla de tales lípidos sólidos, y

45 b) un lípido que se comporta como líquido a temperatura ambiente, formado por ácidos grasos, preferiblemente de cadena corta, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas inferiores a los 30 °C, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), y densidades que oscilan desde 0,88 hasta 0,97 g/cm<sup>3</sup>,

50 donde la mezcla de lípido líquido y lípido sólido presenta un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas entre 20 °C y por debajo de 50 °C, preferiblemente entre 20 °C y 45 °C, más preferiblemente entre 25 °C y 35 °C, incluso más preferiblemente entre 30 °C y 40 °C, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde la mezcla de lípidos líquidos y sólidos, se mezclan en unas razones (lípido líquido:lípido sólido, expresada en % en peso en referencia a la cantidad total de los componentes lipídicos de la cubierta) de 98:2 a 1:99, preferiblemente entre 80:20 y 20:80, más preferiblemente entre 30:60 a 50:50; donde tales razones se expresan como porcentaje en peso de lípidos sólidos y líquidos con respecto a la composición lipídica total de la capa lipídica que recubre el núcleo interior; y

55 donde tal capa lipídica también comprende tensioactivos solubles en lípidos o dispersables en lípidos; donde tales tensioactivos solubles en lípidos o dispersables en lípidos se seleccionan de entre moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a; y

60 c. Una capa pegilada que recubre la capa lipídica que además comprende tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua, donde dicho recubrimiento pegilado que comprende polietilenglicol, o ésteres de PEG y los tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua tienen un HLB superior a 10.

65 Preferiblemente, los lípidos sólidos de la capa lipídica se seleccionan de la lista que consiste en:

- (a) ácidos grasos saturados que presentan valores de  $C \geq 12$  y  $C < 41$  y  $D = 0$ ;
- (b) ácidos grasos insaturados y poliinsaturados trans.  $C > 17$  y  $C < 25$ ,  $D \geq 1$ , x entre 1 y n-2;
- 5 (c) monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de  $C \geq 14$  y  $C < 41$  y  $D = 0$  con sorbitano, polioxietileno, polioxietilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- (d) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos saturados con  $C \geq 3$  y  $C < 41$  y  $D = 0$ ;
- 10 (e) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos insaturados trans; o
- (f) mezclas de cualquiera de los mismos
- 15 Más preferiblemente, los lípidos líquidos de la capa lipídica se seleccionan de la lista que consiste en:
- (a) ácidos grasos saturados que presentan valores de  $C \geq 3$  y  $C \leq 11$  y  $D = 0$ ;
- (b) ácidos grasos insaturados y poliinsaturados cis con  $C \geq 3$  y  $C \leq 23$ ,  $D \geq 1$ , x entre 1 y n-2;
- 20 (c) monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de  $C \geq 3$  y  $C < 14$  y  $D = 0$  con sorbitano, polioxietileno, polioxietilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- (d) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos saturados con  $C < 3$  y  $D = 0$
- 25 (e) triésteres formados entre glicerol y ácidos grasos insaturados cis  $C \geq 3$  y  $C \leq 23$ ,  $D \geq 1$ , x entre 1 y n-2; o
- (f) mezclas de cualquiera de los mismos
- 30 Aún más preferiblemente, la cubierta de capa lipídica está formada por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos en una razón entre 30:70 y 50:50 (razón expresada como porcentaje en peso de lípidos líquidos y sólidos con respecto a la composición lipídica total de la capa) y estas mezclas presentan un proceso de fusión que se inicia en temperaturas comprendidas entre los 30 y 40 grados, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). También preferiblemente, la capa lipídica del núcleo está formada por una mezcla de lípidos sólidos y
- 35 líquidos en una razón de 45:55-35:65 (razón expresada como porcentaje en peso de lípidos líquidos y sólidos con respecto a la composición lipídica total de la capa lipídica) y tales mezclas presentan un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas entre 35 y 40 °C, determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 40 Según la invención, la disolución o dispersión acuosa del núcleo comprende un polímero que gelifica en función de la temperatura (polímero sensible a la temperatura) que puede seleccionarse de la lista que consiste en: poloxámero 407, quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el copolímero de dibloque de polietilenglicol y poli(ácido láctico) (PEG-PLGA-PEG). Preferiblemente, el polímero es el poloxámero 407. Adicionalmente y de forma opcional, la disolución, solución o dispersión acuosa del núcleo puede comprender agua,
- 45 disolución tampón de pH, y/o sales.
- En una realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en: ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres, tales como el ácido esteárico, ácido palmítico, ácido behénico, ácido araquídico palmitoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, dibehenato de glicerilo, palmitato de cetilo, triestearato de glicerilo, trimiristina, tripalmitina; fosfolípidos tales como fosfoglicéridos y esfingolípidos; ácidos y sales biliares, tales como taurocolato, desoxicolato, glicocolato, hiodesoxicolato, litocolato y similares. En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos líquidos se seleccionan de la lista que consiste en: ácidos grasos de cadena corta y media y sus ésteres, tales como ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido pelargónico, ácido enántico, así como triglicéridos de ácido caproico, ácido cáprico, ácido caprílico, o lauroil-polioxiglicéridos; tocoferol u otros derivados de la vitamina E; así como aceites naturales de origen vegetal o animal tales como aceite de oliva, maíz, sésamo, algodón, soja, girasol, coco, o aceite de hígado de bacalao.
- 50
- 55
- 60 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en: diestearato de glicerilo o palmitoestearato de glicerilo, trimiristina, triestearina y colesterol y lecitina de soja (que puede sustituirse por lecitina de huevo o de girasol o de maíz); y los lípidos líquidos se seleccionan de una lista que consiste en: aceite de oliva y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílicos (por ejemplo, el Miglyol 812). Para esta formulación específica, el porcentaje en peso de los reactivos empleados en este caso fue aproximadamente de un 50 %, muy similar a la formulación presentada como
- 65 ejemplo, en cuanto a tamaño y potencial zeta también fue bastante similar, así como la cantidad de fármaco

encapsulado. Se hace notar que, para cualquiera de las formulaciones preferidas de la presente invención, puede sustituirse el aceite de oliva tanto por el de coco como el de aceite de girasol. Si bien, la sustitución del aceite de oliva por el de girasol puede reducir la cantidad de fármaco encapsulado a aproximadamente un 40 %.

5 En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de diestearato de glicerilo que oscila desde el 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, con trimiristina entre el 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, triestearina, entre un 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, y colesterol entre 2-10 %, preferiblemente aproximadamente un 5,30 %, como componentes sólidos, y lecitina de soja y mezcla de componentes líquidos como aceite de oliva entre un 30-70 %, preferiblemente aproximadamente un 45,45 % y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la capa.

15 En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de palmitato de glicerilo en proporciones del 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de componentes líquidos como aceite de oliva 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y ácido caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el % de cada componente, se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

25 En otra realización preferida, la capa lipídica que recubre el núcleo está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones del 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol un 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos más lecitina de huevo y mezcla de componentes líquidos como aceite de oliva un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

30 En otra realización preferida, la capa lipídica que recubre el núcleo está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones de un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de componentes líquidos como aceite de girasol un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

40 En otra realización preferida, la capa lipídica del núcleo está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones de un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y una mezcla de componentes líquidos tales como aceite de hígado de bacalao un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

50 En una realización particularmente preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la mezcla de lípido líquido y lípido sólido es cualitativamente, y opcionalmente cuantitativamente, seleccionada de entre cualquiera de las siguientes (M1, M2, M3 y M6). En la tabla se expresan los mg de cada componente para obtener 220 mg de mezcla de lípidos):

M1		M2		M3		M6	
Dibehenato de glicerilo	25 mg	Dibehenato de glicerilo	75 mg			Dibehenato de glicerilo	37 mg
Trimiristato de glicerilo	25 mg			Trimiristato de glicerilo	37,5 mg	Trimiristato de glicerilo	25 mg
Triestearina	25 mg			Triestearina	37,5 mg	Triestearina	25 mg
Colesterol	12 mg	Colesterol	12 mg	Colesterol	12 mg		

Aceite de oliva virgen	100 mg						
Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg

Preferiblemente la capa lipídica está formada por mezclas de los siguientes lípidos sólidos y líquidos: dibehenato de glicerilo, glicerilo, triestearina, trimiristina, colesterol, aceite de oliva virgen, triglicéridos del ácido cáprico y caprílico y lecitina de soja líquida.

5 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los tensioactivos solubles en lípidos o dispersables en lípidos, se seleccionan de entre moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a 10 tales como lecitina de soja, de huevo, de maíz, de girasol con un HLB de 9,5, ésteres de monooleato (3,3), monoestearato (4,7) o monopalmitato (3,8) de glicerol y monolaurato de glicerina (5,2), ésteres de sorbitano como monooleato (4,3), monoestearato (4,7) o monopalmitato (4,3).

10 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, el recubrimiento pegilado de la capa lipídica comprende polietilenglicol (PEG) o ésteres de PEG con otros componentes más hidrófobos, como el tocoferol succinato-PEG 1000 que permite anclar el PEG a la capa lipídica aumentando su estabilidad. Preferiblemente, esta capa además comprende tensioactivos solubles o dispersables en agua (HLB superior a 10). Preferiblemente son D- $\alpha$  tocoferol ácido polietilenglicol 1000 succinato

15 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, el sistema comprende una o varias enzimas lisosomales y/o proteínas que aumentan el metabolismo celular tales como infliximab, abatacept, rituximab, adalidumab, etanercept, golimumab, certolizumab, sifalimumab, anifrolumab y similares. Preferiblemente las enzimas cargadas pueden ser cualquiera de las empleadas en el tratamiento de enfermedades de deficiencia lisosomal o similares, tales como elosulfasa alfa, velaglucerasa, laronidasa, idursulfasa, galsulfasa, imiglucerasa, agalsidasa, sebelipasa alfa, cerliponasa alfa, velmanasa, alglucosidasa o N-acetil glucosaminidasa. Estas enzimas o proteínas se inmovilizan en el núcleo.

20 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método de preparación del sistema lipídico nanoestructurado de la invención, que comprende:

30 a. añadir una disolución o dispersión acuosa que contiene un polímero que gelifique en función de la temperatura tal como el poloxámero 407, y que comprenda además una o varias enzimas lisosomales o proteínas que aumenten el metabolismo celular tales como infliximab, abatacept, rituximab, adalidumab, etanercept, golimumab, certolizumab, sifalimumab, anifrolumab y similares, a una fase oleosa que comprenda una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, de manera que se forme una capa superior (la fase oleosa) y una capa inferior (fase acuosa); donde la disolución o dispersión acuosa constituye la fase dispersa y la mezcla de lípidos sólidos y líquidos la fase continua o dispersante;

35 b. formar una emulsión primaria a partir de la mezcla obtenida en la etapa a), tal emulsión puede realizarse por ejemplo utilizando homogeneización ultrasónica;

40 c. Aumentar la temperatura para producir la gelificación de la fase dispersa de la emulsión primaria obtenida en la etapa b);

45 d. Añadir al sistema de gel en aceite resultante de la etapa C) una nueva fase acuosa externa que comprenda agentes pegilantes tales como polietilenglicoles, vitamina D o derivados tales como tocoferol-succinato-PEG 1000, coloides hidrófilos (polímero hidrófilo natural como el poli(alcohol vinílico)... ) o péptidos, y preparar una emulsión secundaria, la emulsión puede realizarse por ejemplo usando homogeneización con ultrasonidos, dando lugar a una emulsión múltiple del tipo gel acuoso en aceite en agua; y

50 e. solidificar la capa lipídica, mediante la adición del sistema resultante de la etapa (D) a una dispersión acuosa de tensioactivos con HLB > 10, preferiblemente en un baño de hielo, la capa lipídica se deposita en la superficie de la partícula de gel formándose los sistemas lipídicos nanoestructurados.

55 El sistema lipídico nanoestructurado puede obtenerse como sólidos pulverulentos que puede redispersarse fácilmente en un vehículo acuoso, dando lugar a una dispersión acuosa del NLC con características adecuadas para su administración intravenosa o para cualquier modo de administración adicional. Para obtener el sólido pulverulento pueden emplearse técnicas de secado como es la liofilización o la atomización. En el caso de la liofilización, para evitar la agregación del NLC que impediría la correcta redispersión es necesario añadir agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores que pueden utilizarse incluyen sacarosa, glucosa, maltosa, trehalosa, sorbitol, ciclodextrinas, glicerina entre otros. Para liofilizar, se congela el NLC que contiene los agentes crioprotectores, preferiblemente de manera rápida, para a continuación eliminar el agua mediante liofilización.

60

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la disolución o dispersión acuosa de la etapa a) comprende un polímero termogelificante seleccionado de la lista que consiste en: poloxámero 407, quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el copolímero de dibloque de polietilenglicol y poli(ácido láctico) (PLGA-PEG-PEG). Preferiblemente, el polímero es el poloxámero 407. Adicionalmente y de forma

5

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en: ácidos grasos de cadena larga y sus ésteres, como el ácido esteárico, ácido palmítico, ácido behénico, ácido araquidónico, palmitoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, dibehenato de glicerilo, palmitato de cetilo, triestearato de glicerilo, trimiristina, tripalmitina; fosfolípidos tales como fosfoglicéridos y esfingolípidos; ácidos y sales biliares, tales como taurocolato, desoxicolato, glicocolato, hiodesoxicolato, litocolato y similares. En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos líquidos se seleccionan de la lista que consiste en: ácidos grasos de cadena corta y media y sus ésteres, como ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido pelargónico, ácido enántico, así como triglicéridos de ácido caproico, ácido cáprico, ácido caprílico, o lauroilpolioxiglicéridos; tocoferol u otros derivados de la vitamina E; así como aceites naturales de origen vegetal o animal como aceite de oliva, maíz, sésamo, algodón, soja, girasol, coco, o aceite de hígado de bacalao.

10

15

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en: diestearato de glicerilo o palmitoestearato de glicerilo, trimiristina, triestearina y colesterol y lecitina de soja (que puede sustituirse por lecitina de huevo o de girasol o de maíz); y los lípidos líquidos se seleccionan de la lista que consiste en: aceite de oliva y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812). Para esta formulación específica, las cantidades, en porcentaje en peso de los reactivos empleados fue aproximadamente de un 50 %, similar a la formulación del ejemplo, en cuanto a tamaño y potencial zeta también fue bastante similar, así como la cantidad de fármaco encapsulado. Se hace notar que, para cualquiera de las formulaciones preferidas de la presente invención, puede sustituirse el aceite de oliva tanto por el de coco como el aceite de girasol. Si bien, la sustitución del aceite de oliva por el girasol puede reducir la cantidad de fármaco encapsulado a aproximadamente un 40 %.

20

25

En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de diestearato de glicerilo en proporciones de entre un 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, con trimiristina entre 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, triestearina, entre un 5-20 %, preferiblemente aproximadamente un 11,36 %, y colesterol entre 2-10 %, preferiblemente aproximadamente un 5,30 %, como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de componentes líquidos como aceite de oliva entre un 30-70 %, preferiblemente aproximadamente un 45,45 % y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el % de cada componente, se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la capa lipídica.

30

35

En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de palmitato de glicerilo en proporciones de un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol 5,30 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de lípidos líquidos como aceite de oliva 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el % de cada componente, se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

40

45

En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones de un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol un 5,30 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de lípidos líquidos como aceite de oliva un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el % de cada componente, se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

50

En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones de un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina un 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol un 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de lípidos líquidos como aceite de girasol un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

55

60

En otra realización preferida, la capa lipídica está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones de 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) con trimiristina al 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %), triestearina 11,36 % (preferiblemente entre un 5-20 %) y colesterol 5,3 % (preferiblemente entre un 2-10 %) como componentes sólidos y lecitina de soja y mezcla de componentes líquidos como aceite de hígado de bacalao

65

un 45,45 % (preferiblemente entre un 30-70 %) y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico (por ejemplo, el Miglyol 812) un 15,15 % (preferiblemente entre un 10-20 %). En esta composición el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la cubierta.

- 5 En una realización particularmente preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la mezcla de lípido líquido y lípido sólido de la fase oleosa de la etapa a) es cualitativamente, y opcionalmente cuantitativamente, seleccionada de entre cualquiera de las siguientes (M1 y M2, M3, M6). En la tabla se expresan los mg de cada componente para obtener 220 mg de mezcla de lípidos):

M1		M2		M3		M6	
Dibehenato glicerilo	de 25 mg	Dibehenato glicerilo	de 75 mg			Dibehenato glicerilo	de 37 mg
Trimiristato glicerilo	de 25 mg			Trimiristato glicerilo	de 37,5 mg	Trimiristato glicerilo	de 25 mg
Triestearina	25 mg			Triestearina	37,5 mg	Triestearina	25 mg
Colesterol	12 mg	Colesterol	12 mg	Colesterol	12 mg		
Aceite de oliva virgen	100 mg	Aceite de oliva virgen	100 mg	Aceite de oliva virgen	100 mg	Aceite de oliva virgen	100 mg
Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg	Triglicéridos del ácido cáprico y caprílico	33 mg

- 10 Preferiblemente la fase oleosa de la etapa a) está formada por mezclas de los siguientes lípidos sólidos y líquidos: colesterol, aceite de oliva dibehenato de glicerilo, glicerilo, triestearina, trimiristina, triglicéridos del ácido cáprico y caprílico y lecitina de soja líquida.

- 15 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, los tensioactivos solubles en lípidos o dispersables en lípidos, se seleccionan de entre moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a 10 tales como lecitinas de soja sólida o líquidas o lecitina de huevo con un HLB de 9,5.

- 20 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la nueva fase acuosa externa comprende polietilenglicol o ésteres de PEG con otros componentes más hidrófobos, como el tocoferol succinato-PEG 1000 que permite anclar el PEG a la capa lipídica aumentando su estabilidad. Preferiblemente, la fase acuosa además comprende agentes tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua (HLB > 10). Preferiblemente son D- $\alpha$  tocoferil ácido polietilenglicol 1000 succinato.

- 25 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención o de cualquiera de las realizaciones preferidas, el sistema comprende una o varias enzimas lisosomales y/o proteínas aumentan el metabolismo celular tales como infliximab, abatacept, rituximab, adalimumab, etanercept, golimumab, certolizumab, sifalimumab, anifrolumab y similares. Preferiblemente, las enzimas cargadas pueden ser cualquiera de las empleadas en el tratamiento de enfermedades por almacenamiento lisosomal o similares, tales como elosulfasa alfa, velaglucerasa, laronidasa, idursulfasa, galsulfasa, imiglucerasa, agalsidasa, sebelipasa alfa, cerliponasa alfa, velmanasa, alglucosidasa o N-acetil glucosaminidasa. Estas enzimas o proteínas se inmovilizan en el núcleo.

- 35 Un tercer aspecto de la invención se refiere al sistema lipídico nanoestructurado que puede obtenerse según el segundo aspecto de la invención.

- Un cuarto aspecto de la invención se refiere al sistema lipídico nanoestructurado del primer aspecto de la invención o del tercer aspecto de la invención, que va a usarse como composición farmacéutica.

- 40 Un quinto aspecto de la invención se refiere al sistema lipídico nanoestructurado del primer aspecto de la invención o del tercer aspecto de la invención, donde el sistema comprende una o varias enzimas lisosomales, y puede usarse para el tratamiento de enfermedad por almacenamiento lisosomal.

- 45 En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Hurler, la enfermedad de Herler-Scheie, o la enfermedad de Scheie, y al menos una de las enzimas lisosomales es la laronidasa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la

enfermedad de Hunter, y al menos una de las enzimas lisosomales es la idursulfasa [Elapraxe®].

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Morquio, y al menos una de las enzimas lisosomales es la elosulfasa alfa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es el síndrome de Maroteaux-Lamy, y al menos una de las enzimas lisosomales es la galsulfasa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Gaucher, y al menos una de las enzimas lisosomales es la imiglucerasa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Fabry, y al menos una de las enzimas lisosomales es la agalsidasa b o agalsidasa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Pompe, y al menos una de las enzimas lisosomales es la alglucosidasa.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, la enfermedad por almacenamiento lisosomal es la mucopolisacaridosis de tipo IIIB, y al menos una de las enzimas lisosómicas es la N-acetilglucosaminidasa (véase A Treatment Extension Study of Mucopolysaccharidosis de tipo IIIB, Drug: BMN 250).

Se hace notar que otras enfermedades por almacenamiento lisosomal y las enzimas adecuadas para tratar las mismas se incluyen en los antecedentes de la presente invención. Estas enzimas también pueden cargarse dentro del sistema lipídico nanoestructurado del primer aspecto de la invención para tratar la enfermedad asociada.

Además, el sistema lipídico nanoestructurado de la invención puede servir no sólo para tratar enfermedades lisosomales sino tal y como se ilustra en las figuras 31 a 35, y 37 a 38, y dependiendo del tipo de proteína cargada, también puede usarse para el tratamiento o la prevención de la degeneración del cartílago o el hueso y, por tanto, este sistema podría prevenir o tratar enfermedades tales como artrosis, artritis reumatoide y lupus eritomatoso o de origen traumático. Las enzimas particularmente útiles para dicho tratamiento o prevención de la degeneración del cartílago en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención pueden seleccionarse de la lista que consiste en: laronidasa [Aldurazyme®], idursulfasa [Elapraxe®], elosulfasa alfa y alfa vestronidasa [Mepsevii®]. Una enzima particularmente útil para dicho tratamiento o prevención de la degeneración del hueso en el sistema lipídico nanoestructurado de la invención es la elosulfasa alfa.

Finalmente, el sistema lipídico nanoestructurado de la invención puede administrarse por cualquier vía adecuada tal como administración intramuscular, intravenosa, en bolo, arterial y subcutánea. En caso de que se elija la administración subcutánea, y como se ilustra en los ejemplos, debe usarse un tensioactivo tal como, pero sin limitarse a, sales biliares, desoxicolato, taurocolato, glicocolato, hiodesoxicolato, litocolato, lectinas tales como soja, huevo, maíz, girasol o poloxámeros tales como 188 o 407). Un tensioactivo debe usarse en una concentración que oscila desde el 0,5 hasta el 2 % peso/volumen total que va a administrarse. Los mejores resultados para obtener una suspensión homogénea estable se lograron con taurocolato de sodio (al 1 % en solución salina). El tamaño del NLC después de la resuspensión en taurocolato de sodio se comprobó y permaneció en el intervalo entre 300-400 nm.

Los siguientes ejemplos sirven simplemente para el propósito de ilustrar la presente invención y en ningún caso de limitar la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1.

#### 1.1. Formulación como ejemplo del sistema lipídico nanoestructurado de la invención (formulación 1).

##### Lípidos:

- 75 mg de behenato de glicerilo;
- 75 mg de trimiristina microcristalina;
- 75 mg de triestearina microcristalina;
- 35 mg de colesterol;
- 300 µl p/v aceite de oliva Virgen; y

- 100 µl p/v de triglicéridos de ácido caprílico y cáprico.

Tensioactivos:

- 5 - 250 mg p/v lecitina de soja líquida; y
- 500 mg de poloxámero 188

Fase acuosa

- 10 - 600 µl de poloxámero 407 preparado al 35 % (Sigma Aldrich) en agua.
- 400 µl de elosulfasa alfa (Vimizim® 1mg/ml, Biomarin)

Fase acuosa

- 15 - 600 µl de succinato de D-α tocoferol polietilenglicol 1000 preparado al 0,5 % (Sigma Aldrich)

Preparación

Se disuelven los lípidos en diclorometano. Se prepara una dispersión acuosa de poloxámero 407 al 35 % con la enzima (en este caso elosulfasa alfa para tratar Morquio), se mezcla con disolución de lípidos y se homogeniza mediante sonicación con una sonda ultrasónica (podría sustituirse por un homogeneizador de alta presión) durante 5 minutos. Después de este tiempo, se añade la segunda fase que contiene succinato de D-α tocoferol polietilenglicol 1000 preparado al 0,5 % en PBS y se homogeniza durante 10 minutos. Finalmente se añade la mezcla a una disolución de poloxámero 188 al 5 % en PBS.

La figura 1 muestra un ejemplo de la distribución de tamaño de los sistemas lipídicos nanoestructurados (NLC), determinada mediante DLS.

Para conservar la formulación de NLC, se ultracentrifugan las partículas a 35000 rpm durante 25 minutos a 14-20 °C se retira el sobrenadante y se resuspende el NLC en una disolución acuosa que contiene un crioprotector (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, ciclodextrinas...). La dispersión obtenida se congela sumergiéndola en nitrógeno líquido (de -60 a -80 °C) para liofilizarse. Se almacena el polvo sólido liofilizado en un ambiente seco y fresco. La figura 2 ilustra un ejemplo del tamaño de partícula antes y después de liofilizar y reconstituir las formulaciones y la figura 3 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los sistemas lipídicos nanoestructurados en las que se observa la morfología externa e interna del NLC que contiene la enzima.

Para conocer el grado de inmovilización de la enzima en el NLC, se evaluó la actividad enzimática en estos sistemas antes y después de romperlos para cuantificar la cantidad de enzima que podría adsorberse en la superficie o inmovilizarse en el núcleo de las partículas. La actividad enzimática se determinó mediante técnicas de fluorimetría descritas en "*Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples*". Para romper las partículas y liberar la enzima inmovilizada en el núcleo gelificado, se trató el NLC Triton X 100. En la figura 4 se muestran los resultados.

1.2. Estabilidad de los NLC en plasma humano

Se determinó la estabilidad en plasma de la enzima inmovilizada en el NLC, para cuantificar el nivel de protección frente a proteasas. Este ensayo se realizó incubando el NLC en muestras de plasma procedentes de 20 pacientes sanos en diferentes tiempos. Se extrajeron muestras de plasma cada hora y se aisló el NLC mediante ultracentrifugación. Se resuspendieron las muestras de NLC en agua y se midió el tamaño y la actividad enzimática adsorbida remanente (figura 5). Tal como se observa, se mantuvo la actividad de la enzima durante menos cinco horas en las dos composiciones de NLC estudiadas.

1.3. Estudio de internalización celular de los sistemas lipídicos nanoestructurados en línea celular de condrocitos TC28a2.

Se estudió la capacidad de internalización del NLC del ejemplo 1.1 que contenía la enzima en líneas celulares de condrocitos TC28a2 y también la capacidad de internalización del NLC y se determinó la liberación intracelular de la enzima.

Los condrocitos se sembraron en placas y se incubaron durante una hora en presencia de 150 mg de NLC liofilizado reconstituido. Las células se desprenden mediante tripsina y después de varios lavados, se lisan las células

mediante ultrasonidos y se recupera el extracto proteico. La cantidad total de proteína se determina mediante el método de LOWRY (kit Biorad; n.º de catálogo de protocolo 500-0119. Luego, se cargó un gel de electroforesis de poliacrilamida con la misma cantidad de proteína y se revela con tinción Sypro. También se incluyeron un patrón de peso molecular, la enzima libre y células sin tratar. El resultado se muestra en la figura 6. Todas las formulaciones, el patrón y la enzima libre mostraron la banda proteica correspondiente a la elosulfasa alfa con la excepción de las células sin tratar.

Las mismas muestras también se analizaron mediante técnicas de fluorimetría para determinar la actividad enzimática usando el método descrito en "Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples". Los resultados se ilustran en la figura 7 en la que puede observarse un aumento en la actividad enzimática de las células tratadas con el NLC en comparación con las células sin tratar (diferencias significativas  $p < 0,05$ , prueba de la t). Estos resultados indican la internalización del NLC y la liberación intracelular del enzima en su forma activa.

Para estudiar la internalización del NLC en los condrocitos, se usaron técnicas de microscopía confocal láser y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para la microscopía confocal, el NLC que contenía elosulfasa alfa, se tiñó con DID (sonda que tiñe los lípidos de color rojo) y se incubó en el cultivo conjunto de condrocitos durante tiempo variable a 37 °C o a 4 °C. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se muestran en la figura 8. En ella, se muestran pequeñas zonas de color rojo (correspondiente al NLC con elosulfasa alfa) dentro las células que están teñidas de verde. Mediante el uso de esta técnica se observó el NLC en el interior de los condrocitos a partir de 30 min de incubación, tanto a 37 °C como a 4 °C. En la figura 8 A y 8 B se muestra el resultado a 37 °C después de 1 y 2 horas de incubación y en la figura 8C a 4 °C después de 1 hora de incubación.

Como ensayo de confirmación, se obtuvieron imágenes de las células fijadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se inmovilizaron células incubadas durante 1 hora en presencia de NLC con enzima y se observó mediante TEM. Las imágenes se muestran en la figura 9. De forma resumida, puede observarse la internalización de NLC en los condrocitos mediante fagocitosis y/o pinocitosis estableciendo invaginaciones que rodean e internalizan el NLC (A y B). Además, es posible observar algunas de los NLC que se internalizan mediante endocitosis a través de (C) y (D). Una vez en el interior del citoplasma, se forman vesículas que poco a poco son atrapadas por los lisosomas (figura 10).

1.4. Estudio de internalización celular de los sistemas lipídicos nanoestructurados en muestras de cartílago de donantes sanos.

Para estos estudios se usaron muestras de tejido de cartílago obtenidas después de intervención quirúrgica en traumatología de dos donantes sin enfermedades metabólicas. Los estudios consistieron en la incubación del tejido en medio de cultivo que contenía NLC con elosulfasa alfa a diferentes tiempos y su estudio mediante TEM y técnicas proteómicas para determinar las funciones biológicas expresadas por la proteína antes y después del tratamiento.

- Estudio de internalización mediante microscopía electrónica de transmisión:

La figura 11 muestra microfotografías de TEM de condrocitos en tejido el cartílago. En el tejido sin tratar se observan condrocitos con lisosomas y con depósitos naturales de GAG típicos de células sanas (pequeñas manchas de color gris claro). Tras 4-6 horas de tratamiento se observa que el NLC internalizado en los depósitos en el interior de las células adquiere mayor volumen y un color negro debido a los lípidos.

- Estudio proteómico del cartílago

Se trató el cartílago y se analizó mediante técnicas proteómicas mediante un dispositivo triple TOF 6600 para el análisis de datos. Este procedimiento se realizó con el objetivo de comparar el tejido normal con un segundo grupo que consistía en cartílago incubado con el NLC que no incluía la enzima, un tercer grupo constituido por el tejido de cartílago incubado con la enzima elosulfasa alfa a dosis de 100 µg/100 µl, y finalmente un cuarto grupo constituido por el tejido del cartílago incubado con elosulfasa alfa inmovilizada en el NLC a una dosis aproximada de 50 ng de enzima/100 µl (concentraciones 2000 veces menor que la enzima libre). El tiempo de tratamiento de las células con cada uno de los sistemas anteriores (NLC, enzima libre e inmovilizada en NLC) fue de 2 horas, 6 horas, 24 horas y 96 horas. En la figura 12 se muestra la expresión total de proteínas relacionadas con los procesos de síntesis y metabolización del queratán sulfato y el glucosaminoglicano que se acumula en lisosomas de pacientes con Morquio A.

Con el fin de analizar los resultados obtenidos a partir de las muestras de tejido de los dos donantes, se usaron diagramas de Venn, para encontrar similitudes en la expresión proteica en los tejidos tras el tratamiento con el NLC (figura 13) y a partir de las similitudes se realizó un nuevo análisis proteómico. La figura 14 muestra ejemplos de la expresión de algunas proteínas relacionadas con la función biológica de procesos de biosíntesis, catabolización y metabolización del queratán sulfato, que son los que se alteran en la enfermedad de Morquio A. El tejido tratado con la elosulfasa inmovilizada en el NLC produce una mayor expresión de las funciones biológicas relacionadas con este

glucosaminoglicano, incluso a tiempos más prolongados (96 horas) y teniendo en cuenta la menor dosis de enzima empleada en el tratamiento con la elosulfasa alfa inmovilizada (2000 veces menor concentración que en el tratamiento con la enzima libre)

5 La administración de la elosulfasa alfa en NLC también produce un aumento en la expresión de proteínas de procesos biológicos relacionados con el desarrollo y crecimiento del cartílago (figura 31), la matriz extracelular (figura 32) y del colágeno (figura 33) en muestras de cartílago procedentes de donantes sanos, tratadas a diferentes tiempos. Este aumento en la expresión de proteína indica un aumento en la síntesis de estas moléculas que está estrechamente relacionada con la regeneración del tejido conjuntivo. Además, los resultados inmunohistoquímicos  
10 realizados usando un ensayo funcional indica que la enzima inmovilizada en NLC induce un aumento de la expresión de la proteína Lumican en fibroblastos procedentes de muestras de tejido de pacientes sanos y de pacientes con Morquio, indicando su potencial para promover los procesos de regeneración y reparación de este tipo de tejidos.

15 1.5. Estudio de internalización celular de los sistemas lipídicos nanoestructurados en muestras cirugía de amígdala de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Morquio.

Se usó un tejido de amígdala de un paciente diagnosticado con Morquio A. Las muestras se donaron después de una cirugía de amigdalectomía. El donante (de 5 años) llevaba bajo tratamiento con Vimizim® (elosulfasa alfa)  
20 durante un período de año y medio. Para realizar este estudio, se extrajo el tejido y se aislaron las células aisladas del tejido usando técnicas de explantes.

Las células o tejidos se incubaron durante dos horas en medio que contenía elosulfasa alfa inmovilizada en NLC, se estudió la internalización mediante microscopía electrónica de transmisión y se cuantificó el queratán sulfato que se acumuló en los depósitos antes y después de los tratamientos.  
25

- Estudio de internalización mediante microscopía electrónica de transmisión:

Las microfotografías de TEM del tejido antes y después de los tratamientos se muestran en la figura 15 y 16. Las microfotografías del tejido sin tratar muestran macrófagos con gran cantidad de depósitos de GAG (queratán sulfato), que aparecen como manchas redondeadas de color gris y que son típicos de esta enfermedad. La aparición de un gran número de estos depósitos en los macrófagos sugiere que el tratamiento con Vimicin® del paciente no está siendo del todo eficaz. En la figura 16, se muestran muestras de tejido incubadas durante una hora con el NLC que contiene enzima inmovilizada. Puede observarse un cambio progresivo de color de los depósitos, de gris claro a negro, a medida que aumentó el tiempo de incubación (parte superior derecha de la figura 1 hora y el resto dos horas de incubación). Este cambio se produce debido a la internalización y la acumulación progresiva del NLC en el interior de los lisosomas. Los lípidos que forman el NLC son moléculas mucho más densas a los electrones que los glucosaminoglicanos, de modo que este es el motivo por el que aparecen como manchas oscuras.  
30  
35

40 - Cuantificación de la actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de muestras de células y tejidos empleando las mismas técnicas usadas anteriormente en la sección 1.3. Los resultados se muestran en la figura 17 en donde se observa un aumento de la actividad enzimática celular de más del doble cuando los tejidos se incubaron con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC en comparación con el tejido sin tratar.  
45

1.6. - Estudio de biodistribución *in vivo* del NLC que contiene elosulfasa alfa en modelo de ratón, después de su administración intravenosa en bolo.

50 Para determinar la distribución *in vivo*, se administró el NLC que contenía la enzima por vía intravenosa en animales.

Para este conjunto de estudios, se usaron diferentes formulaciones: la formulación de NLC descrita en el apartado 1.1 del ejemplo 1 y una segunda formulación con composición idéntica, pero en este caso se aumentó la cantidad de succinato de D-succinato  $\alpha$  tocoferol polietilenglicol 1000 a para aumentar el grado de pegilación superficial. Para realizar el experimento, se tiñó el NLC con el fluoróforo DID, y se administraron mediante inyección en la vena lateral de la cola del ratón. A las 24 horas de la administración, se sacrificó a los animales, y se extrajeron los órganos y los tejidos para estudios mediante microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión (TEM).  
55

Las imágenes de microscopía confocal confirmaron la presencia de NLC en todos los tejidos analizados, que incluye el pulmón, riñón, hígado, bazo, músculo esquelético o tejido del sistema nervioso central. Como ejemplo en la figura 18, se muestran los resultados del estudio de microscopía confocal correspondiente a una pequeña sección del cerebro. El NLC dentro del tejido cerebral que indica que estos sistemas han sido capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).  
60  
65

Para confirmar que el NLC se distribuyó en las estructuras cerebrales, se desarrolló un estudio de microscopía TEM. La figura 19 muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas. Los resultados confirman la capacidad del NLC para atravesar la BHE. En la figura puede observarse cómo el NLC atraviesa el epitelio que está vascularizado.

- 5 La figura 20 muestra varios NLC en el interior de astrocitos y en la figura 22 dos imágenes en la que se observan claramente cómo el NLC se localiza en el citoplasma de las neuronas.

Finalmente, y a modo de ejemplo se incluyen en la figura 22 imágenes obtenidas usando microscopía confocal de fluorescencia de muestras procedentes de diferentes órganos extraídos de los ratones en los que pueden distinguirse la presencia de NLC en todos ellos después de transcurridas 24 horas de su administración intravenosa. Las letras A, B y C corresponden a muestras de pulmón en las que se aprecia el NLC bien distribuidos en el tejido. Las letras D, E y F corresponden al hígado con numerosos NLC bien distribuidos por todo el órgano y, las últimas letras G, H, I corresponden a imágenes de tejido muscular que demuestran que el NLC administrado también ha alcanzado este tejido.

- 15 1.7. Estudio *ex vivo* de regeneración de cartílago mediante estimulación de NLC cargado con elosulfasa alfa.

Se trataron muestras de cartílago humano de cirugía de rodilla con elosulfasa alfa inmovilizada en NLC durante 24 h. También se analizaron varios controles de muestras de cartílago: tejido no tratado, elosulfasa sola y NLC sin tratamiento previo (vacío). Después de este periodo de tiempo de incubación, se extrajeron las proteínas de los cultivos y se analizaron mediante técnicas proteómicas mediante un dispositivo triple TOF 6600. La dosis de formulaciones de NLC fue de 50 ng/100 ml. Una vez extraída la proteína, se realizó el análisis como sigue:

25 Identificación de proteínas mediante CL-EM/EM

Se cargó una cantidad de 100 mg de cada muestra en un gel de SDS-PAGE al 10 %. La banda de proteína se detectó mediante tinción fluorescente con Sypro-Ruby (Lonza, Suiza), se escindió y se procesó mediante digestión triptica manual tal como se describe en otra parte (Shevchenko *et al.*, 1996). Los péptidos se extrajeron llevando a cabo tres incubaciones de 20 min en 40 ml de acetonitrilo al 60 % disuelto en HCOOH al 0,5 %. Los extractos peptídicos resultantes se combinaron, se concentraron en un dispositivo SpeedVac y se almacenaron a -20 °C.

30 Análisis espectrométrico de masas

Se separaron cuatro mg de péptidos digeridos usando cromatografía en fase inversa. Gradiente (sistema de microcromatografía líquida; Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX, acoplado a espectrómetro de masas Triple TOF 6600 de alta velocidad (SCIEX) con una fuente de microflujo). La columna analítica utilizada para el análisis fue una columna de fase inversa basada en sílice Chrom XP C18 150 × 0,30 mm, tamaño de partícula de 3 mm y tamaño de poro de 120 Å (Eksigent, SCIEX). La columna de trampa fue una YMC-TRIART C18 (YMC Technologies, Teknokroma con un tamaño de partícula de 3 mm y un tamaño de poro de 120 Å, conectada en línea con la columna analítica. La bomba de carga administró una disolución de ácido fórmico al 0,1 % en agua a 10 ml/min. La microbomba generó una velocidad de flujo de 5 ml/min y se hizo funcionar en condiciones de elución en gradiente, usando ácido fórmico al 0,1 % en agua como fase móvil A, y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo como fase móvil B. Los péptidos se separaron usando un gradiente de 90 minutos que oscila desde el 2 % hasta el 90 % de fase móvil B (fase móvil A: acetonitrilo al 2 %, ácido fórmico al 0,1 %; fase móvil B: acetonitrilo al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %).

La adquisición de datos se realizó usando un sistema Triple TOF 6600 (SCIEX, Foster City, CA) usando un flujo de trabajo dependiente de datos. Las condiciones de la fuente y la interfaz fueron las siguientes: flotación por tensión de pulverización iónica (ISV) 5500 V, gas de cortina (CUR) 25, energía de colisión (CE) 10 y gas de fuente iónica 1 (GS1) 25. El instrumento se hizo funcionar con el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX, EE. UU.). Los criterios de conmutación se establecieron en iones mayores que la razón de masa a carga ( $m/z$ ) 350 y menores que  $m/z$  1400 con un estado de carga de 2-5, una tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 cuentas (cps). Los iones diana anteriores se excluyeron durante 15 s. El instrumento se calibró automáticamente cada 4 horas usando como calibrador externo péptidos tripticos de PepCalMix.

55 Análisis de datos

Los archivos de datos del análisis de EM/EM se procesaron utilizando el software ProteinPilot™ 5.0.1 de Sciex (el algoritmo Paragon™ se utilizó para la búsqueda en bases de datos y Progroup™ para la agrupación de datos). Los datos se buscaron usando la base de datos específica de humanos de Uniprot. La tasa de descubrimientos falsos se realizó usando un método de ajuste no lineal que presenta sólo aquellos resultados que informaron de una tasa global de descubrimientos falsos del 1 % o mejor. (Shilov *et al.*, 2007) Las proteínas identificadas de interés, véase la tabla a continuación, se analizaron con el software Fun Rich (<http://www.funrich.org/>). Las interacciones proteína-proteína se exploraron usando la base de datos en recurso web (<https://string-db.org/>).

65

ES 2 983 965 T3

Entrada	Nombre de entrada	Nombres de proteínas	Nombres de los genes	Organismo
P13647	K2C5_HUMAN	Queratina	KRT5	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02679	FIBG_HUMAN	Cadena gamma del fibrinógeno	FGG PRO2061	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08133	ANXA6_HUMAN	Anexina	ANXA6 ANX6	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02538	K2C6A_HUMAN	Queratina,	KRT6A K6A KRT6D	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08582	TRFM_HUMAN	Melanotransferrina	MPF MAP97 MFI2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P09525	ANXA4_HUMAN	Anexina A4	ANXA4 ANX4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08779	K1C16_HUMAN	Queratina	KRT16 KRT16A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02671	FIBA_HUMAN	Fibrinógeno	FGA	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P16403	H12_HUMAN	Histona)	HIST1H1CH1F2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P04004	VTNC_HUMAN	Vitronectina	VTN	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9Y240	CLC11_HUMAN	Miembro A de la familia 11 del dominio lectina de tipo C	CLEC11A CLECSF3 LSLCL SCGF	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P36955	PEDF_HUMAN	Factor derivado del epitelio pigmentario	SERPINF1 PEDF PIG35	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q04695	K1C17_HUMAN	Queratina	KRT17	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P62987	RL40_HUMAN	Ubiquitina-proteína ribosómica 60S L40	UBA52 UBCEP2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08294	SODE_HUMAN	Superóxido dismutasa extracelular	SOD3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02771	FETA_HUMAN	Alfa-fetoproteína	AFP HPAFP	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02788	TRFL_HUMAN	Lactotransferrina	LTF GIG12 LF	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08493	MGP_HUMAN	Proteína Gla de la matriz	MGP MGLAP GIG36	<i>Homo sapiens</i> (humano)

ES 2 983 965 T3

P06727	APOA4_HUMAN	Apolipoproteína A-IV	APOA4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P61626	LYSC_HUMAN	Lisozima C	LYZ LZM	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P35613	BASI_HUMAN		BSG UNQ6505/PRO21383	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P01009	A1AT_HUMAN	Alfa-1-antitripsina (inhibidor de la alfa-1 proteasa) (alfa-1-antiproteinasas) (serpina A1) [Escindida en: péptido corto de AAT (SPAAT)]	SERPINA1 AAT PI PRO0684 PRO2209	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02649	APOE_HUMAN	Apolipoproteína E (Apo-E)	APOE	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P10451	OSTP_HUMAN	Osteopontina	SPP1 BNSP OPN PSEC0156	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9Y639	NPTN_HUMAN	Neuroplastina	NPTN SDFR1 SDR1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P13646	K1C13_HUMAN	Queratina	KRT13	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9BYJ0	FGFP2_HUMAN	Proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos 2	FGFBP2 UNQ425/PRO1065 KSP37	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q07507	DERM_HUMAN	Dermatopontina	DPT	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P81605	DCD_HUMAN	Dermcidina	DCD AIDD DSEP	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P06756.	ITAV_HUMAN	Integrina alfa-V	ITGAV MSK8 VNRA VTNR	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02774	VTDB_HUMAN	Proteína de unión a vitamina D	GC	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P12111	CO6A3_HUMAN	Colágeno alfa-3	COL6A3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02751	FINC_HUMAN	Fibronectina (FN)	FN1 FN	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P04264	K2C1_HUMAN	Queratina, citoesquelética 1 de tipo II	KRT1 KRTA	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P35527	K1C9_HUMAN	Queratina, citoesquelética 9 de tipo I	KRT9	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P12109	CO6A1_HUMAN	Colágeno alfa-1	COL6A1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P49747	COMP_HUMAN	Proteína de matriz oligomérica de	COMP	<i>Homo</i>

ES 2 983 965 T3

		cartílago		<i>sapiens</i> (humano)
P13645	K1C10_HUMAN	Queratina, citoesquelética 10 de tipo I	KRT10 KPP	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P35908	K22E_HUMAN	Queratina, epidérmica citoesquelética 2 de tipo II	KRT2 KRT2A KRT2E	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P12110	CO6A2_HUMAN	Colágeno alfa-2	COL6A2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P51888	PRELP_HUMAN	Prolargina	PRELP SLRR2A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P07355	ANXA2_HUMAN	Anexina A2	ANXA2 ANX2 ANX2L4 CAL1H LPC2D	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O75339	CILP1_HUMAN	Proteína 1 de la capa intermedia de cartílago	CILP UNQ602/PRO1188	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q08431	MFGM_HUMAN	Lactadherina	MFGE8	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P07585	PGS2_HUMAN	Decorina	DCN SLRR1B	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02768	ALBU_HUMAN	Albúmina sérica	ALB GIG20 GIG42 PRO0903 PRO1708 PRO2044 PRO2619 PRO2675 UNQ696/PRO1341	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P10915	HPLN1_HUMAN	Proteína de unión a hialuronano y proteoglicano 1	HAPLN1 CRTL1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q15582	BGH3_HUMAN	Proteína ig-h3 inducida por el factor de crecimiento transformante beta) (RGD-CAP)	TGFB1 BIGH3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P21810	PGS1_HUMAN	Biglicano	BGN SLRR1A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P16112	PGCA_HUMAN	Proteína del núcleo de agregano	ACAN AGC1 CSPG1 MSK16	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08758	ANXA5_HUMAN	Anexina A5	ANXA5 ANX5 ENX2 PP4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08670	VIME_HUMAN	Vimentina	VIM	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02533	K1C14_HUMAN	Queratina, citoesquelética 14 de tipo I	KRT14	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O15335	CHAD_HUMAN	Condroadherina	CHAD SLRR4A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P04083	ANXA1_HUMAN	Anexina A1	ANXA1 ANX1 LPC1	<i>Homo sapiens</i> (humano)

ES 2 983 965 T3

Q8IUL8	CILP2_HUMAN	Proteína de la capa intermedia de cartílago 2	CILP2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P20774	MIME_HUMAN	Mimecan	OGN OIF SLRR3A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P10909	CLUS_HUMAN	Clusterina	CLU APOJ CLI KUB1 AAG4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q06828	FMOD_HUMAN	Fibromodulina	FMOD FM SLRR2E	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P51884	LUM_HUMAN	Lumican	LUM LDC SLRR2D	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P06733	ENOA_HUMAN	Alfa-enolasa	ENO1 ENO1L1 MBPB1 MPB1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P68871	HBB_HUMAN	Subunidad beta de hemoglobina	HBB	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O60687	SRPX2_HUMAN	Proteína SRPX2 que contiene repeticiones de Sushi	SRPX2 SRPUL	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O43854	EDIL3_HUMAN	Proteína que contiene repeticiones de tipo EGF y dominios de tipo discoidina I 3	EDIL3 DEL1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P60174	TPIS_HUMAN	Triosafosfato isomerasa	TPI1 TPI	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P07996	TSP1_HUMAN	Trombospondina-1	THBS1 TSP TSP1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P63261	ACTG_HUMAN	Actina, citoplásmica 2	ACTG1 ACTG	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P69905	HBA_HUMAN	Subunidad alfa de hemoglobina	HBA1; HBA2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9BXN1	APN_HUMAN	Asporina	APN PLAP1 SLRR1C UNQ215/PRO241	<i>Homo sapiens</i>
P04406	G3P_HUMAN	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH GAPD CDABP0047 OK/SW-cl.12	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P21589	5NTD_HUMAN	5'-nucleotidasa (5'-NT)	NT5E NT5 NTE	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P00338	LDHA_HUMAN	L-lactato deshidrogenasa A	LDHA PIG19	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P00558	PGK1_HUMAN	Fosfoglicerato cinasa 1	PGK1 PGKA MIG10 OK/SW-cl.110	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P08123	CO1A2_HUMAN	Colágeno alfa-2	COL1A2	<i>Homo sapiens</i> (humano)

ES 2 983 965 T3

Q06830	PRDX1_HUMAN	Peroxirredoxina-1	PRDX1 PAGA PAGB TDPX2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q5VTE0	EF1A3_HUMAN	Supuesto factor de elongación 1-alfa de tipo 3	EEF1A1P5 EEF1AL3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02458	CO2A1_HUMAN	Colágeno alfa-1	COL2A1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P06396	GELS_HUMAN	Gelsolina (AGEL)	GSN	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02545	LMNA_HUMAN	Prelamina-A/C	LMNA LMN1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P62805	H4_HUMAN	Histona H4	HIST1H4A H4/A H4FA; HIST1H4B H4/I H4FI; HIST1H4C H4/G H4FG; HIST1H4D H4/B H4FB; HIST1H4E H4/J H4FJ; HIST1H4F H4/C H4FC; HIST1H4 H4/H H4FH; HIST1H4I H4/M H4FM; HIST1H4J H4/E H4FE; HISTT1H4K H4/D H4FD; HIST1H4L H4/K H4FK; HIST2H4A H4/N H4F2 H4FN HIST2H4; HIST2H4B H4/O H4FO; HIST4H4	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02647	APOA1_HUMAN	Apolipoproteína A-I	APOA1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02765	FETUA_HUMAN	Alfa-2-HS-glicoproteína	AHSG FETUA PRO2743	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9BQE3	TBA1C_HUMAN	Tubulina alfa-1C	TUBA1C TUBA6	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P14618	KPYM_HUMAN	Piruvato cinasa PKM	PKM OIP3 PK2 PK3 PKM2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O75596	CLC3A_HUMAN	Miembro A de la familia 3 del dominio lectina de tipo C	CLEC3A CLECSF1 UNQ700/PRO1345	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02452	CO1A1_HUMAN	Colágeno alfa-1	COL1A1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02042	HBD_HUMAN	Subunidad delta de hemoglobina	HBD	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q71DI3	H32_HUMAN	Histona H3.2	HIST2H3A; HIST2H3C H3F2 H3FM; HIST2H3D	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q99983	OMD_HUMAN	Osteomodulina	OMD SLRR2C UNQ190/PRO216	<i>Homo sapiens</i> (humano)

P24821	TENA_HUMAN	Tenascina (TN)	TNC HXB	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q7Z7G0	TARSH_HUMAN	Diana de Nesh-SH3	ABI3BP NESHBP TARSH	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P07237	PDIA1_HUMAN	Proteína disulfuro isomerasa	P4HB ERBA2L PDI PDIA1 PO4DB	<i>Homo sapiens</i> (humano)
O15232	MATN3_HUMAN	Matrilina-3	MATN3	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q92743	HTRA1_HUMAN	Serina proteasa HTRA1	HTRA1 HTRA PRSS11	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P29353	SHC1_HUMAN	Proteína 1 transformadora de SHC	SHC1 SHC SHCA	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q9BTM1	H2AJ_HUMAN	Histona H2A.J	H2AFJ	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P06576	ATPB_HUMAN	Subunidad beta de ATP sintasa, mitocondrial	ATP5F1B ATP5B ATPMB ATPSB	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P34059	GALNS_HUMAN	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (EC 3.1.6.4)	GALNS	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P00915	CAH1_HUMAN	Anhidrasa carbónica 1	CA1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q99879.	H2B1M_HUMAN	Histona H2B tipo 1-M	HIST1H2BM H2BFE	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P32119	PRDX2_HUMAN	Peroxirredoxina-2	PRDX2 NKEFB TDPX1	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P04075	ALDOA_HUMAN	Fructosa-bisfosfato aldolasa A	ALDOA ALDA	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02652	APOA2_HUMAN	Apolipoproteína A-II	APOA2	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P36957	ODO2_HUMAN	Dihidrolipolilisina -residuo succiniltransferasa componente del complejo de 2-oxoglutarato deshidrogenasa, mitocondrial	DLST DLTS	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P02461	CO3A1_HUMAN	Colágeno alfa-1	COL3A1	<i>Homo sapiens</i> (humano)

5

A partir de la comparación del diferente tratamiento de las muestras de cartílago, se identificaron proteínas relacionadas con queratán sulfato (el glucosaminoglicano de especial relevancia en el desarrollo fisiológico de la matriz de cartílago) con una fiabilidad del 99 % de la presencia de estas proteínas, generando mediante el programa "String" mencionado anteriormente. Las interacciones proteína-proteína (representadas por flecha y ciclos donde el nombre de las proteínas se muestra cerca de ciclos) se muestran en la figura 35, representadas como las líneas que se cruzan donde se encuentra la conexión entre proteínas (bolas). Tal como puede observarse, sólo la interacción proteína-proteína en muestras tratadas con NLC cargado con elosulfasa alfa es relevante en caso de expresión de

queratán sulfato, incluso en comparación con las muestras tratadas con elosulfasa alfa libre, véase la tabla a continuación.

Entrada	Nombre de entrada	Nombres de proteínas	Nombres de los genes	Organismo
P51888	PRELP_HUMAN	Prolargina	PRELP SLRR2A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P16112	PGCA_HUMAN	Agrecano	ACAN AGC1 CSPG1 MSK16	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P20774	MIME_HUMAN	Mimecan	OGN OIF SLRR3A	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q06828	FMOD_HUMAN	Fibromodulina	FMOD FM SLRR2E	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P51884	LUM_HUMAN	Lumican	LUM LDC SLRR2D	<i>Homo sapiens</i> (humano)
Q99983	OMD_HUMAN	Osteomodulina	OMD SLRR2C UNQ190/PR0216	<i>Homo sapiens</i> (humano)
P34059	GALNS_HUMAN	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa	GALNS	<i>Homo sapiens</i> (humano)

5 En la figura 35 se muestra la función regulada por incremento de la estimulación ribosómica relacionada con la biosíntesis de proteoglicanos de queratán sulfato después de la incubación conjunta de NLC cargado con elosulfasa alfa. Este resultado confirmó la capacidad de la elosulfasa alfa inmovilizada para aumentar la expresión de proteínas implicadas en la regeneración del cartílago de la matriz. Además, se ha demostrado que el NLC permite que la elosulfasa alfa entre en las células y estimule las proteínas que normalmente se expresan en la matriz del tejido cartilaginoso.

#### 1.8. Estudio de la administración subcutánea de formulaciones de NLC.

15 La administración subcutánea de formulaciones de NLC cargado con elosulfasa alfa en ratas se evaluó incorporando diferentes tensioactivos (sales biliares, desoxicolato, taurocolato, glicocolato, hiodesoxicolato, litocolato), lectinas (soja, huevo, maíz, girasol), poloxámeros (188, 407). Todos ellos se usaron en diferentes concentraciones que oscilaron entre el 0,5-2 % en peso/volumen total que va a administrarse. Los mejores resultados para obtener una suspensión homogénea estable se lograron con taurocolato de sodio (al 1 % en solución salina). Se comprobó que el tamaño del NLC después de la resuspensión en taurocolato de sodio permanecía en el intervalo entre 300-400 nm.

25 La formulación de NLC se tiñó con una sonda fluorescente, DID' (DiI<sub>C-18</sub>(5) sólida (1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina, sal de 4-clorobenzenosulfonato), y se dispersó a una concentración de 200 mg/ml en solución salina con taurocolato de sodio al 1 %.

Las formulaciones se administraron por vía subcutánea (150 µl) en la región lumbar de tres ratas (Sprague Dawley; machos; 300-330 mg). Después de 24 h, se sacrificó a los animales con CO<sub>2</sub> y se retiraron los órganos y tejidos para su examen bajo microscopía de fluorescencia confocal.

30 Las imágenes confocales (figura 36) de todos los tejidos analizados mostraron la presencia de formulaciones de NLC, incluyendo las muestras de pulmón, costillas, riñón, bazo, músculo y sistema nervioso central, confirmando de este modo que los NLC estaban ampliamente distribuidos a través de todo el organismo.

## REIVINDICACIONES

1. Sistema lipídico nanoestructurado que comprende nanopartículas que a su vez comprenden:
- 5 a. un núcleo gelificado que comprende una disolución, solución o dispersión acuosa que comprende un polímero sensible a la temperatura que se convierte en gel en función de la temperatura y que comprende además una o más enzimas, preferiblemente enzimas lisosomales, u otras proteínas con actividad en el metabolismo celular, inmovilizadas en el núcleo;
- 10 b. una capa lipídica que recubre el núcleo interior que comprende una mezcla de:
- i. un lípido sólido, sólido o ceroso a temperatura ambiente, es decir, 25 °C a 101,3 kPa, que comprende ácidos grasos, preferiblemente de cadena larga, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas por encima de 35 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), con un valor de HLB inferior a 10 y densidades entre 0,8 y 1 g/cm<sup>3</sup>, o una mezcla de tales lípidos sólidos, y
- 15 ii. un lípido que se comporta como líquido a temperatura ambiente, constituido por ácidos grasos, preferiblemente de cadena corta, con un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas por debajo de 30 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), y densidades que oscilan desde 0,88 hasta 0,97 g/cm<sup>3</sup>,
- 20 en el que la mezcla de lípido líquido y lípido sólido presenta un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas entre 20 °C y por debajo de 50 °C, determinadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), en el que la mezcla de lípidos líquidos y sólidos, se mezcla en una razón (lípido líquido:lípido sólido) de 98:2 a 1:99 %, en el que tales razones se expresan como porcentaje en peso de lípidos líquidos y sólidos con respecto a la composición lipídica total de la capa lipídica que recubre el núcleo interior;
- 25 en el que tal capa lipídica también comprende tensioactivos solubles o dispersables en lípidos; en el que tales tensioactivos solubles o dispersables en lípidos, se seleccionan de entre moléculas tensioactivas con valores de HLB inferiores a 10; y
- 30 c. un recubrimiento pegilado de la capa lipídica que también comprende tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua, en el que dicho recubrimiento pegilado comprende polietilenglicol o ésteres de PEG y los tensioactivos solubles en agua o dispersables en agua tienen un HLB superior a 10.
- 35 2. Sistema lipídico según la reivindicación 1, en el que los ácidos grasos de la capa lipídica comprenden la siguiente fórmula:
- 40 C:D n-x,
- donde: C: representa el número de átomos de carbono del ácido graso;
- 45 D: el número de dobles enlaces en el ácido graso;
- n: la posición del doble enlace distal, donde n es el número total de carbonos y x un número proporcionado por la posición, y donde se considera que en el caso de enlaces múltiples están separados por un grupo metileno;
- 50 en el que los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en:
- a. ácidos grasos saturados que presentan valores de C≥12 y C<41 y D=0;
- 55 b. ácidos grasos insaturados y poliinsaturados trans. C>17 y C<25, D≥1, x entre 1 y n-2;
- c. monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de C≥14 y C<41 y D=0 con sorbitano, polioxietileno, polioxietilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- 60 d. triésteres formados entre el glicerol y ácidos grasos saturados con C≥3 y C<41 y D=0;
- e. triésteres formados entre el glicerol y ácidos grasos insaturados trans; o
- f. cualquier combinación de los mismos; y
- 65 y en el que los lípidos líquidos se seleccionan de la lista que consiste en:

- a. ácidos grasos saturados que presentan valores de  $C \geq 3$  y  $C \leq 11$  y  $D=0$ ;
- 5 b. ácidos grasos insaturados y poliinsaturados cis con  $C \geq 3$  y  $C \leq 23$ ,  $D \geq 1$ , x entre 1 y n-2;
- c. monoésteres de ácidos grasos saturados con valores de  $C \geq 3$  y  $C < 14$  y  $D=0$  con sorbitano, polioxietileno, polioxietilensorbitano, glicerina o dietilenglicol;
- 10 d. triésteres formados entre el glicerol y ácidos grasos saturados con  $C < 3$  y  $D=0$
- e. triésteres formados entre la glicerina y ácidos grasos insaturados cis  $C \geq 3$  y  $C \leq 23$ ,  $D \geq 1$ , x entre 1 y n-2; o
- f. cualquier combinación de los mismos.
- 15 3. Sistema lipídico según la reivindicación 1 ó 2, en el que la capa lipídica está formada por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos en una razón entre 30:70 y 50:50 y en el que tal mezcla presenta un proceso de fusión que se inicia a temperaturas entre 30 y 40 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 20 4. Sistema lipídico según la reivindicación 1 ó 2, en el que la capa lipídica está formada por una mezcla de lípidos sólidos y líquidos en una razón de 35:65 y 45:55 y tales mezclas tienen un proceso de fusión que se inicia (temperatura de comienzo) a temperaturas entre 35 y 40 °C, tal como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 25 5. Sistema lipídico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la disolución, solución o dispersión de naturaleza acuosa del núcleo comprende un polímero sensible a la temperatura seleccionado de la lista que consiste en: poloxámero 407, quitosano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y copolímero de dibloque de polietilenglicol y poli(ácido láctico) (PLGA-PEG-PEG).
- 30 6. Sistema lipídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el núcleo gelificado comprende una o más enzimas seleccionadas de la lista que consiste en: elosulfasa alfa, velaglucerasa, laronidasa, idursulfasa, galsulfasa, imiglucerasa, agalsidasa, sebelipasa alfa, cerliponasa alfa, velmanasa o alglucosidasa, inmovilizadas en el núcleo.
- 35 7. Sistema lipídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el núcleo gelificado comprende una o más proteínas con actividad en el metabolismo celular seleccionadas de la lista que consiste en infliximab, abatacept, rituximab, adalidumab, etanercept, golimumab, certolizumab, sifalimumab y anifrolumab, inmovilizadas en el núcleo.
- 40 8. Sistema lipídico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los lípidos sólidos se seleccionan de la lista que consiste en: diestearato de glicerilo o palmitoestearato de glicerilo, trimiristina, triestearina y colesterol y lecitina de soja (que puede sustituirse por lecitina de huevo o de girasol o de maíz); y los lípidos líquidos se seleccionan de la lista que consiste en: aceite de oliva y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico.
- 45 9. Sistema lipídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la capa lipídica está formada por una mezcla de diestearato de glicerilo o palmitoestearato de glicerilo en proporciones que oscilan desde el 5-20 %, con trimiristina entre el 5-20 %, triestearina entre el 5-20 %, y colesterol entre el 2-10 %, como componentes sólidos, y lecitina de soja y una mezcla de componentes líquidos tales como aceite de oliva entre el 30-70 %, y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico entre el 10-20 %, donde el porcentaje de cada componente se refiere a su proporción en porcentaje en peso/peso con respecto a la cantidad total de lípidos que forman la capa.
- 50 10. Sistema lipídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la capa lipídica está formada por una mezcla de dibehenato de glicerilo en proporciones que oscilan desde el 5-20 %, con trimiristina entre el 5-20 %, triestearina entre el 5-20 % y colesterol entre el 2-10 % como componentes sólidos y lecitina de huevo y una mezcla de lípidos líquidos tales como aceite de oliva entre el 30-70 % y triglicéridos de ácidos cáprico y caprílico entre el 10-20 %, donde el % se refiere a porcentaje en peso/peso de cada componente relacionado con la cantidad total de lípidos que forman la capa.
- 55 60 11. Sistema lipídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la capa lipídica que recubre el núcleo acuoso está formada por mezclas de los siguientes lípidos sólidos y líquidos: dibehenato de glicerilo, glicerilo, triestearina, trimiristina, colesterol, aceite de oliva, triglicéridos de ácido cáprico y caprílico y lecitina de soja líquida.
- 65

12. Método para la preparación del sistema lipídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que método comprende:
- 5 a. incorporar una disolución o dispersión acuosa que contenga un polímero que se convierte en gel en función de la temperatura como poloxámero 407, y que comprende además una o varias enzimas lisosomales u otras proteínas con actividad en el metabolismo celular, a una fase oleosa que comprenda una mezcla de lípidos sólidos y líquidos, de manera que se forme una capa superior (la fase oleosa) y una capa inferior (fase acuosa); donde la disolución o dispersión acuosa constituye la fase dispersa y la mezcla de lípidos sólidos y líquidos la fase continua o dispersante;
- 10 b. formar una emulsión primaria a partir de la mezcla de la etapa a), esta emulsión puede realizarse, por ejemplo, utilizando homogeneización por ultrasonidos;
- 15 c. aumentar la temperatura para que la fase dispersa de la emulsión primaria de la etapa b) (las gotículas formadas a partir de la disolución o dispersión de naturaleza acuosa) cambien químicamente a partículas o gotículas de gel;
- 20 d. añadir al sistema de gel en aceite resultante de la etapa (C) una nueva fase acuosa externamente que comprenda agentes pegilantes tales como polientilenglicoles, derivados de la vitamina D sustituidos como tocoferol-succinato-PEG 1000, agentes hidrofílicos de superficie (polímeros hidrófilos naturales tales como poli(alcohol vinílico)...) o péptidos, para formar una emulsión secundaria, en el que dicha emulsión puede formarse, por ejemplo, usando ultrasonidos, dando como resultado un sistema sólido de gel en aceite en agua; y
- 25 e. posteriormente se solidifican los lípidos mediante la adición del sistema resultante de la etapa (D) a una dispersión acuosa de tensioactivos con un HLB superior a 10, preferiblemente en un baño de hielo, en el que los lípidos se depositarán sobre la superficie de la partícula de gel formándose así los sistemas nanoestructurados.
- 30 13. Sistema lipídico nanoestructurado obtenido según la reivindicación 12.
14. Sistema lipídico nanoestructurado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13, para su uso en terapia.
- 35 15. Sistema lipídico nanoestructurado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 13, para su uso en el tratamiento o la prevención de la degeneración de cartílago o hueso o para su uso en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosomal.



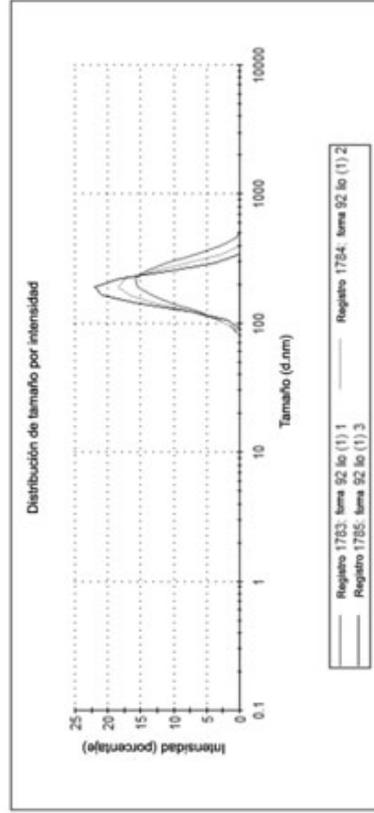
Fig. 2

Formulación después de liofilizar

Promedio Z (d.nm): 297,0  
 PDI: 0,504  
 Ordenada en el origen: 0,779  
 Calidad del resultado: Buena

Tamaño (d.nm): Intensidad en %; Desv. est. (d.nm):

Pico 1:	215,7	100,0	71,77
Pico 2:	0,000	0,0	0,000
Pico 3:	0,000	0,0	0,000

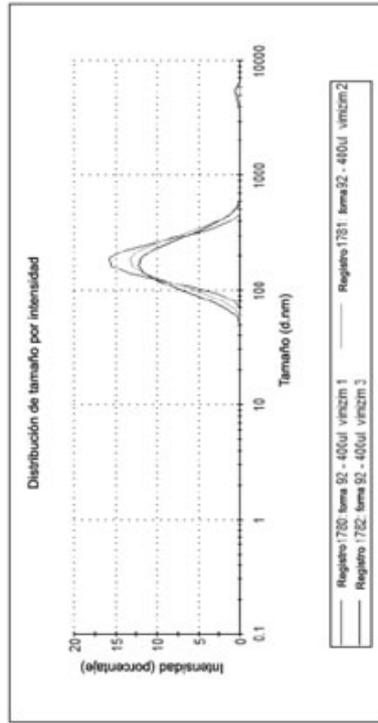


Formulación antes de liofilizar

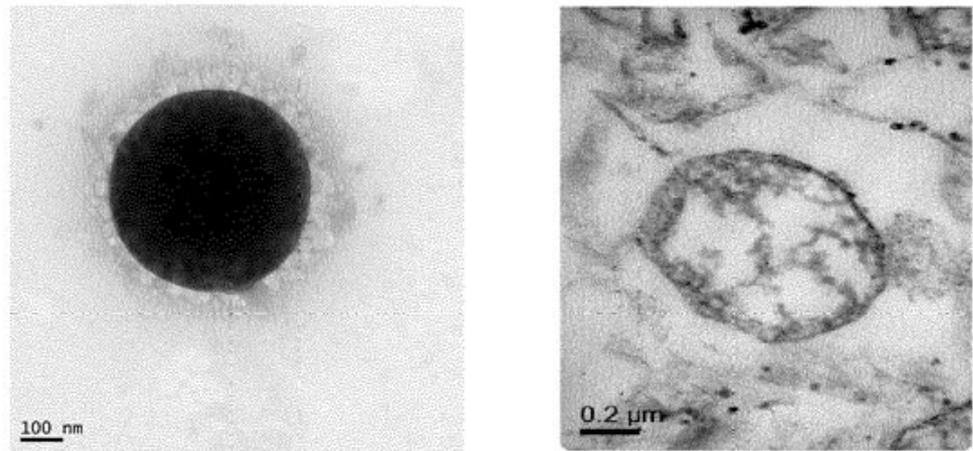
Promedio Z (d.nm): 175,7  
 PDI: 0,150  
 Ordenada en el origen: 0,882  
 Calidad del resultado: Buena

Tamaño (d.nm): Intensidad en %; Desv. est. (d.nm):

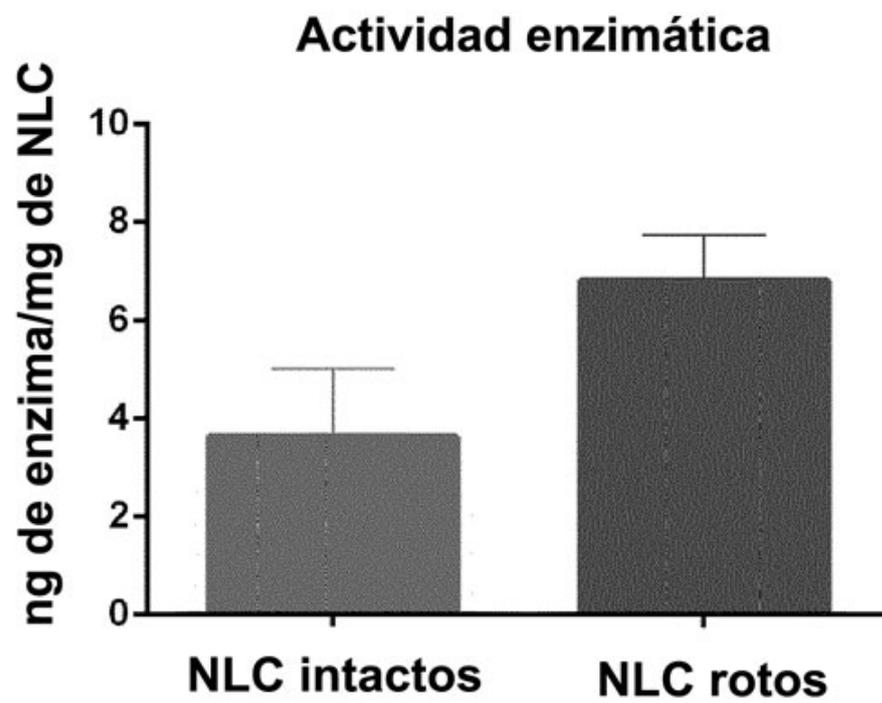
Pico 1:	191,2	100,0	65,61
Pico 2:	0,000	0,0	0,000
Pico 3:	0,000	0,0	0,000

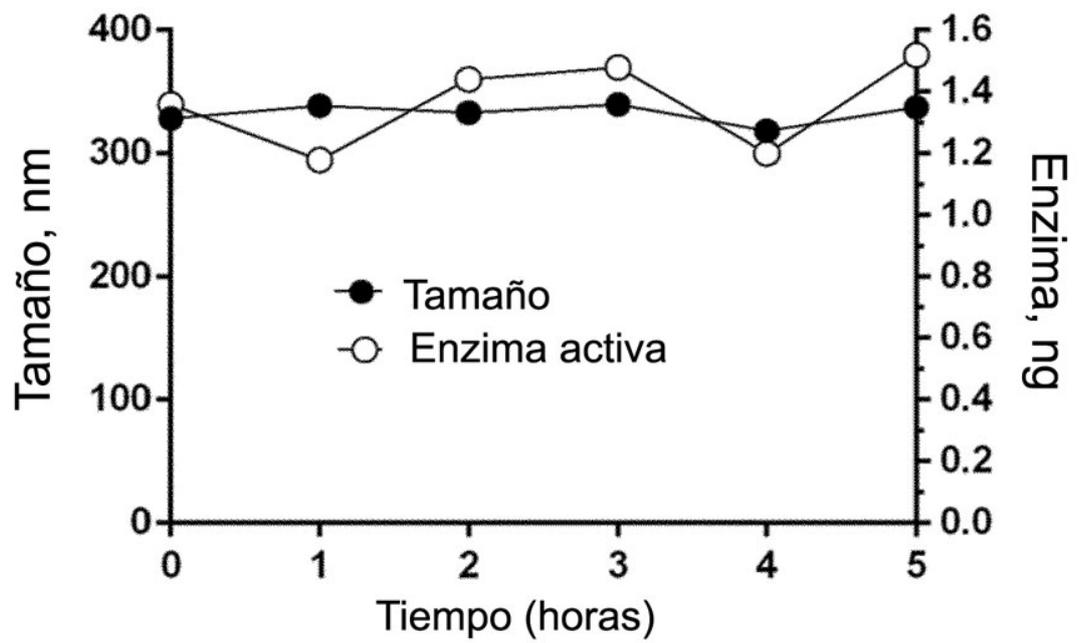


**Fig. 3**

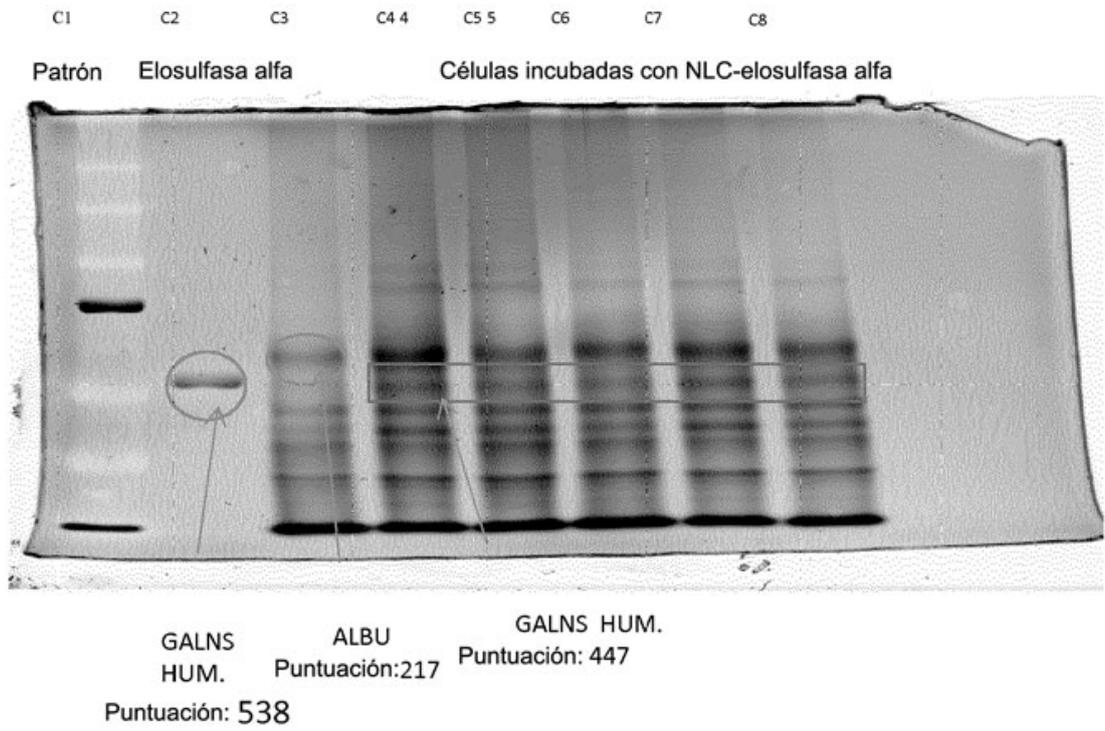


**Fig. 4**

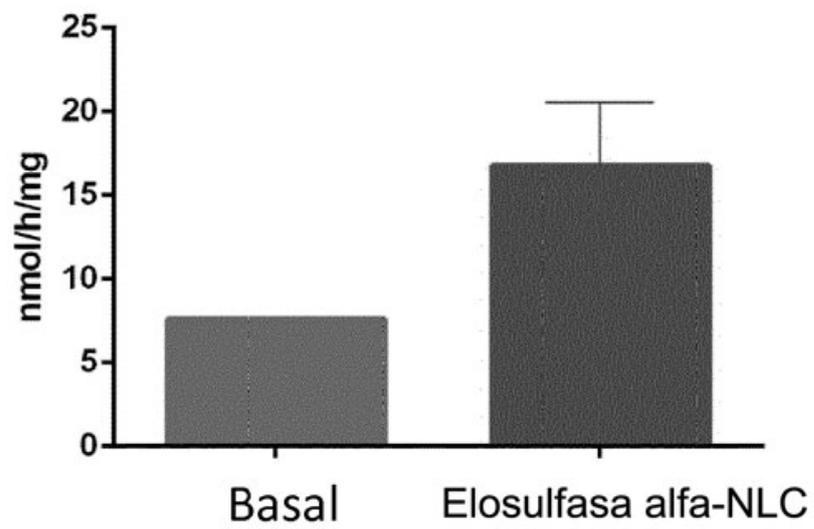


**Fig. 5**

**Fig.6**

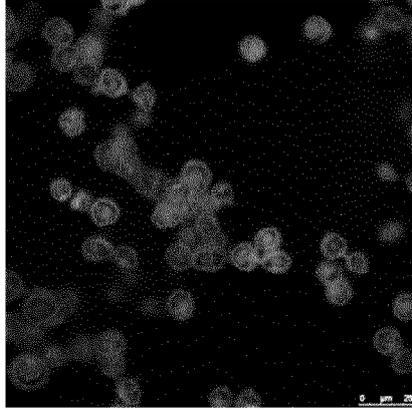


**Fig.7**

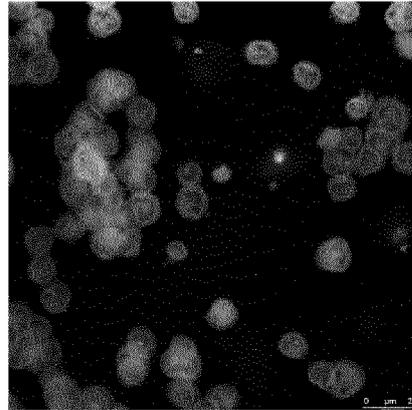


**Fig.8**

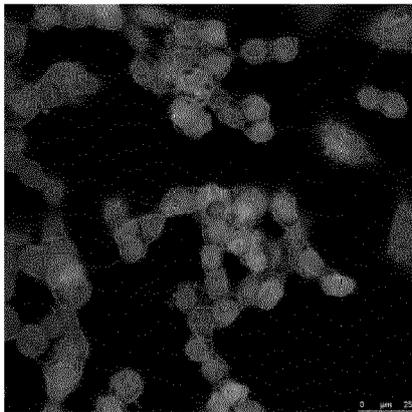
A)



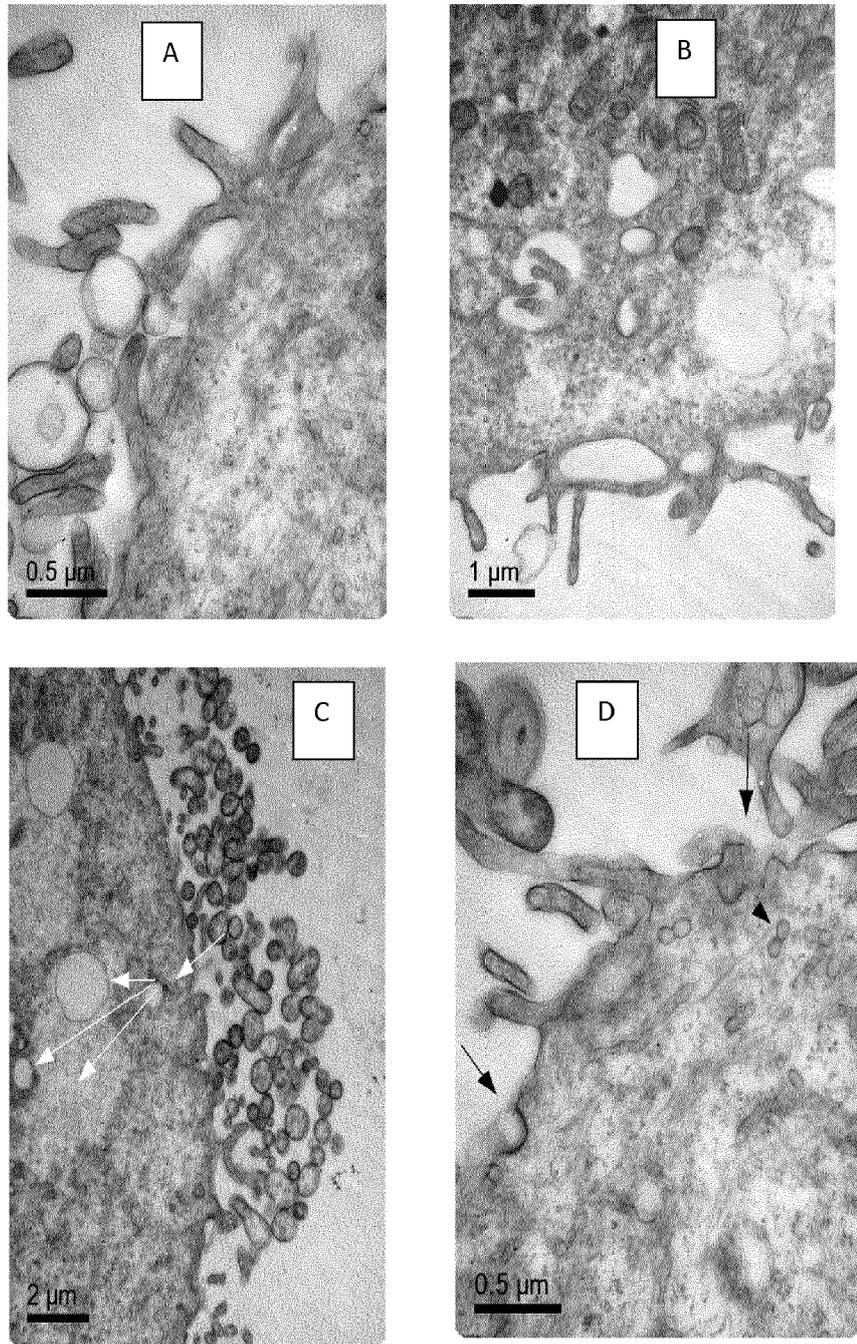
B)



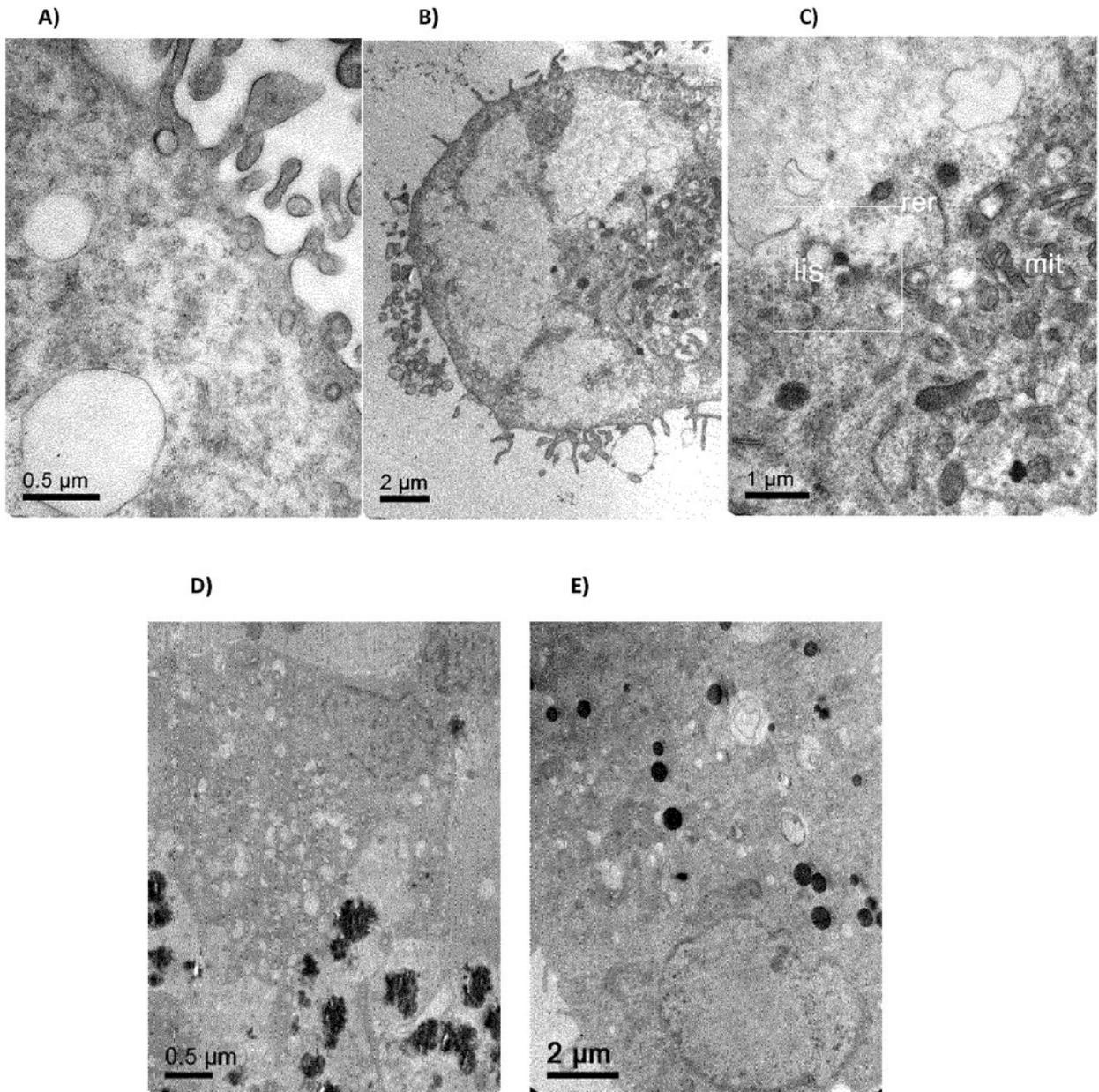
C)



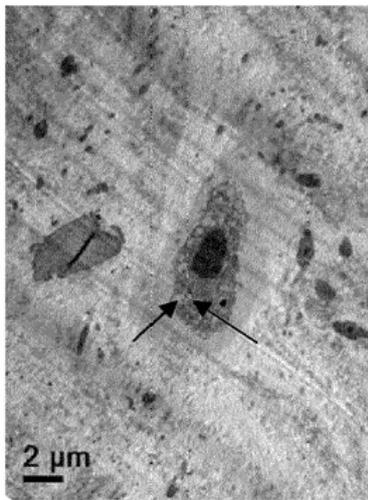
**Fig. 9**



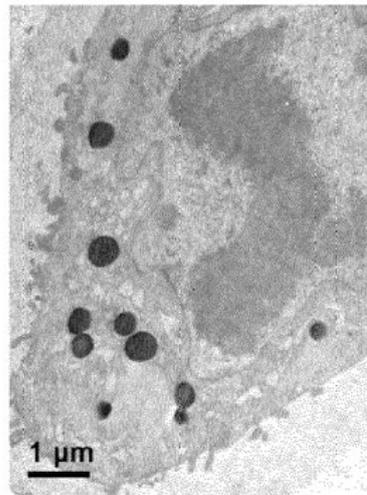
**Fig. 10**



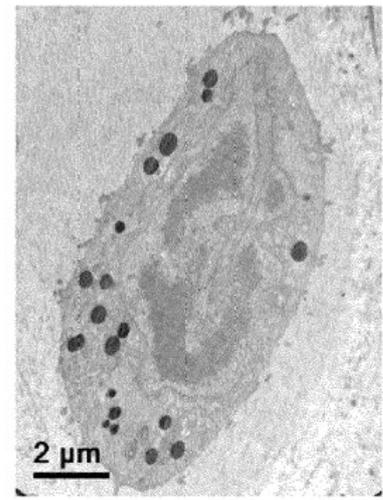
**Fig. 11**



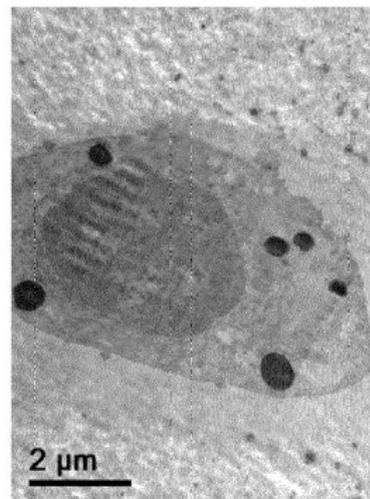
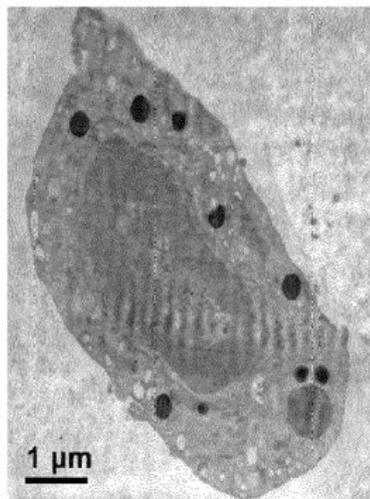
Condrocito de cartílago  
sin tratamiento



Después de 3 horas de  
incubación con elosulfasa  
alfa-NLC

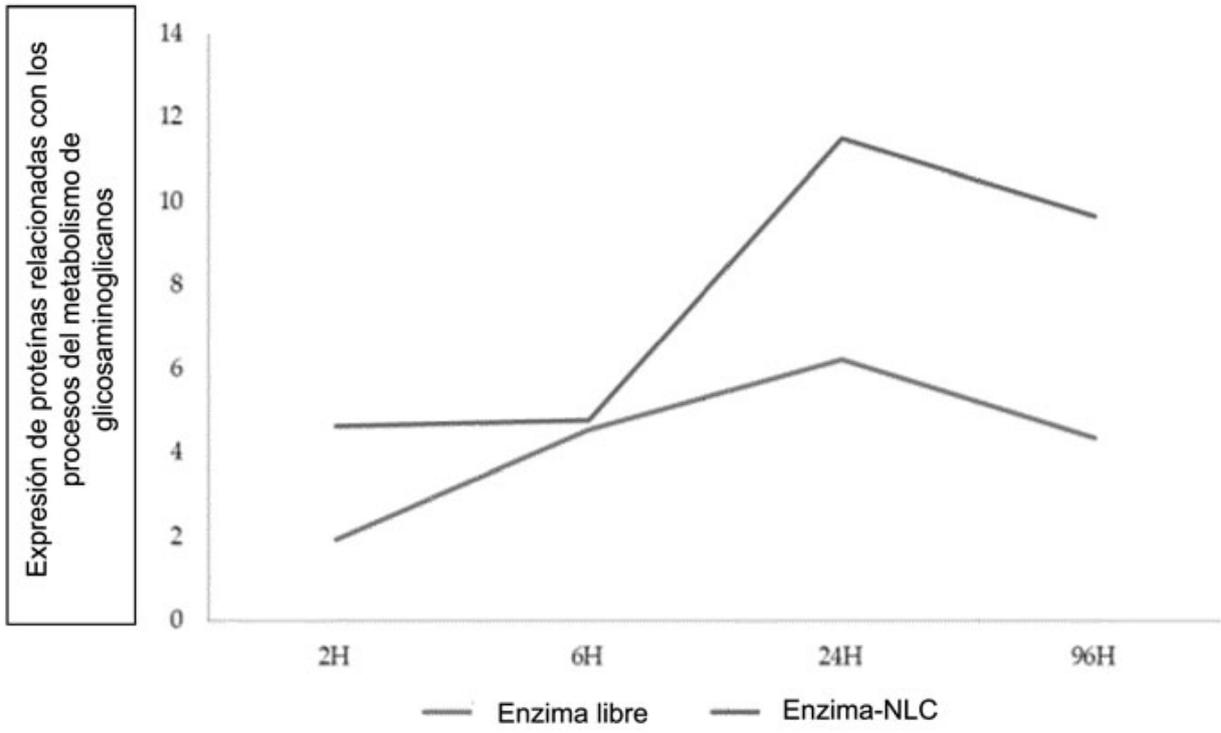


Después de 4 horas de  
incubación con elosulfasa  
alfa-NLC

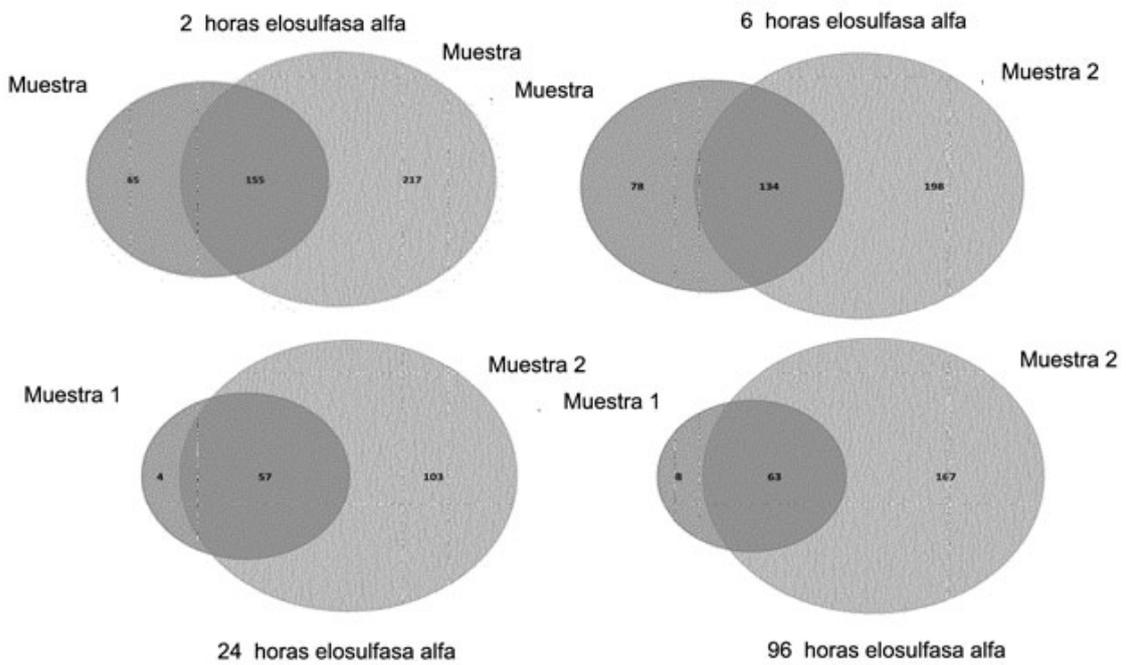


Después de 6 horas de  
incubación con elosulfasa  
alfa-NLC

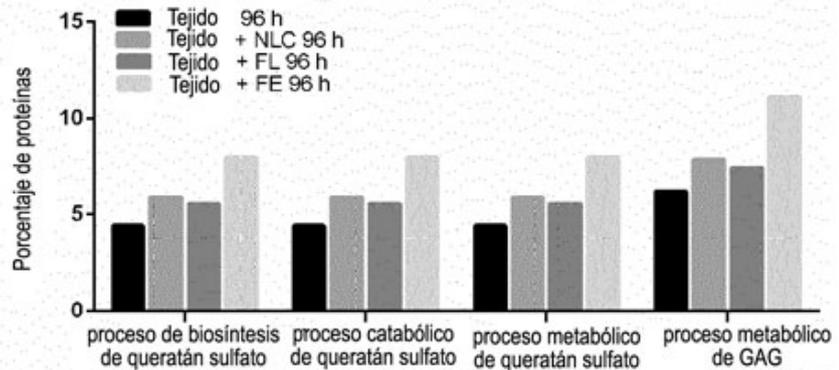
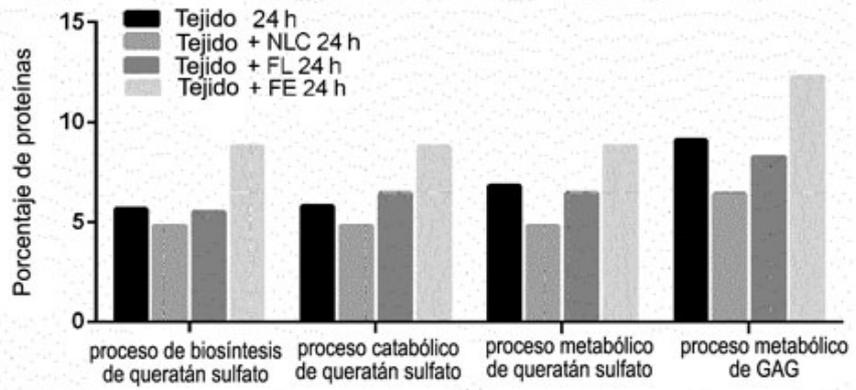
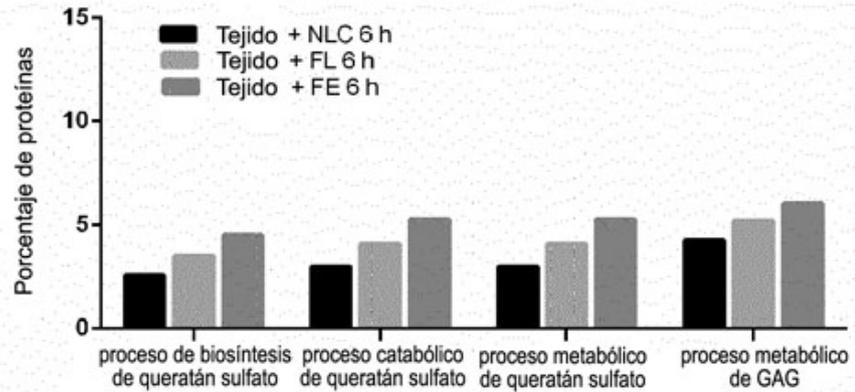
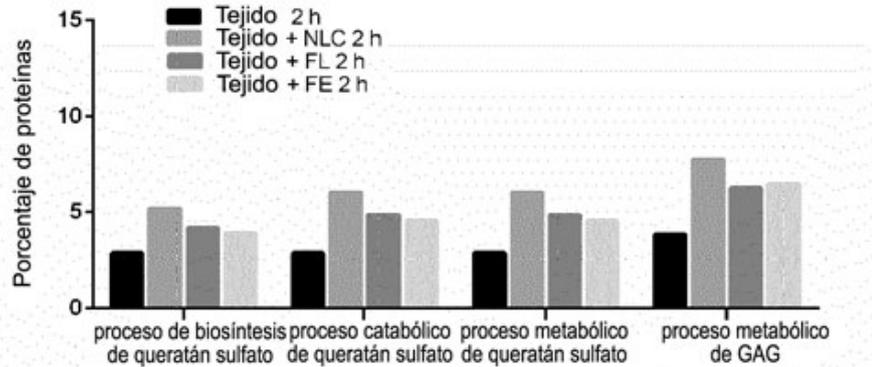
**Fig. 12**



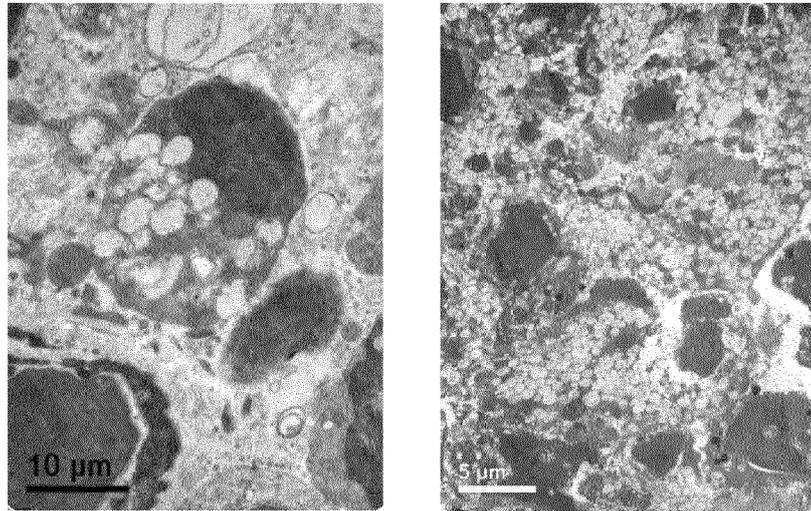
**Fig. 13**



**Fig. 14**

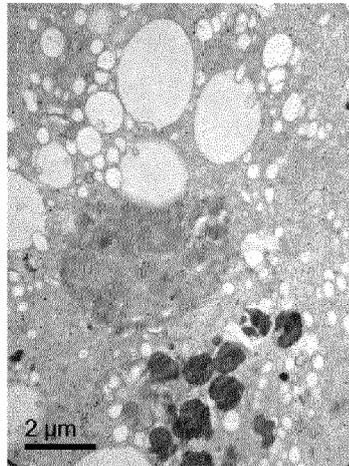


**Fig. 15**

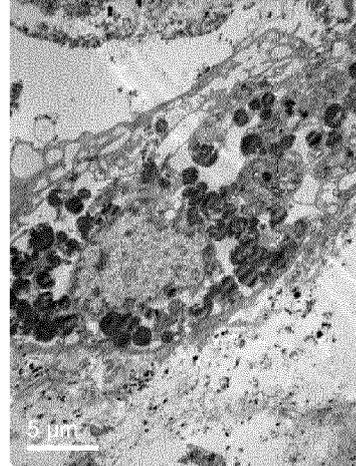


**Fig. 16**

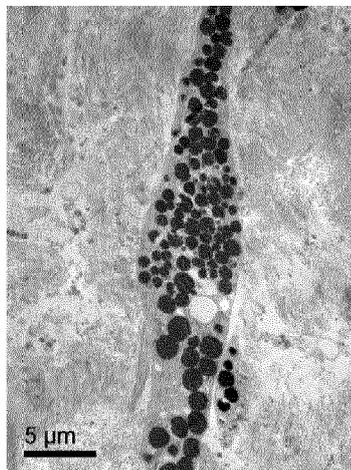
**A)**



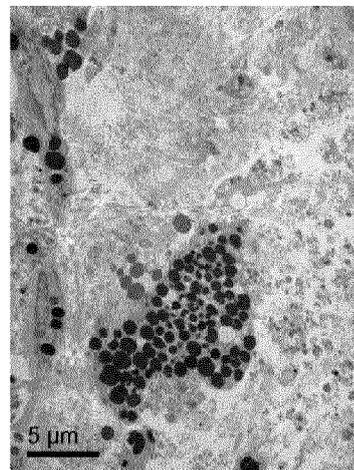
**B)**



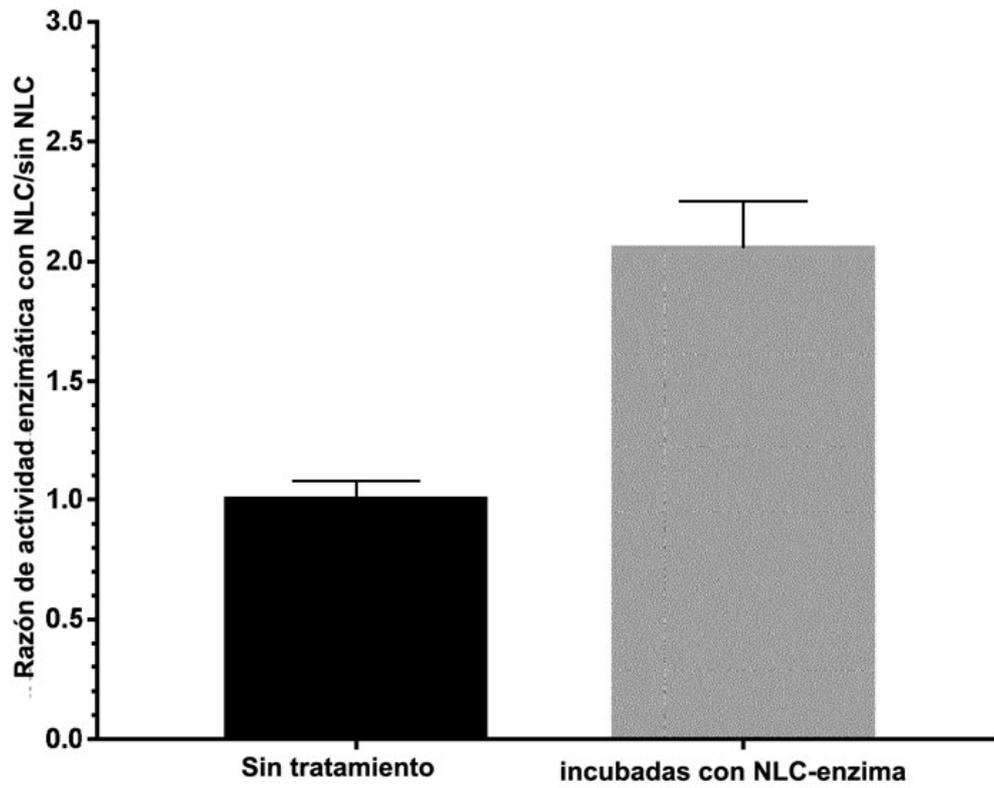
**C)**



**D)**



**Fig. 17**



**Fig. 18**

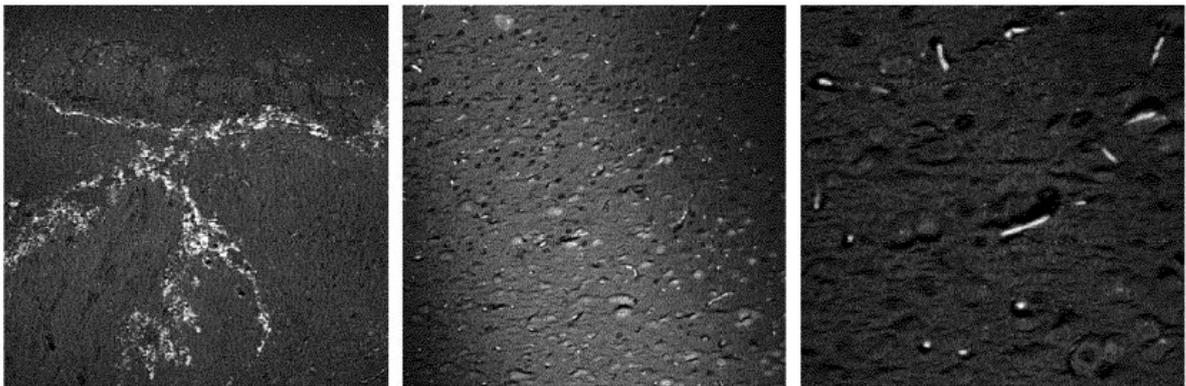


Fig 19

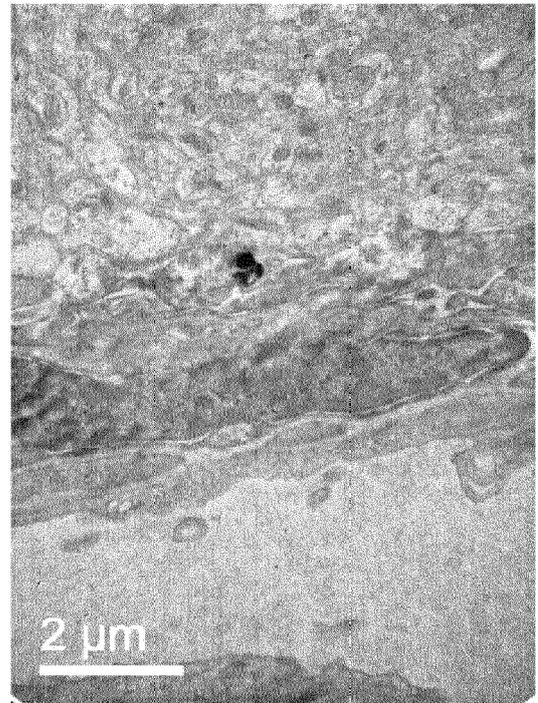
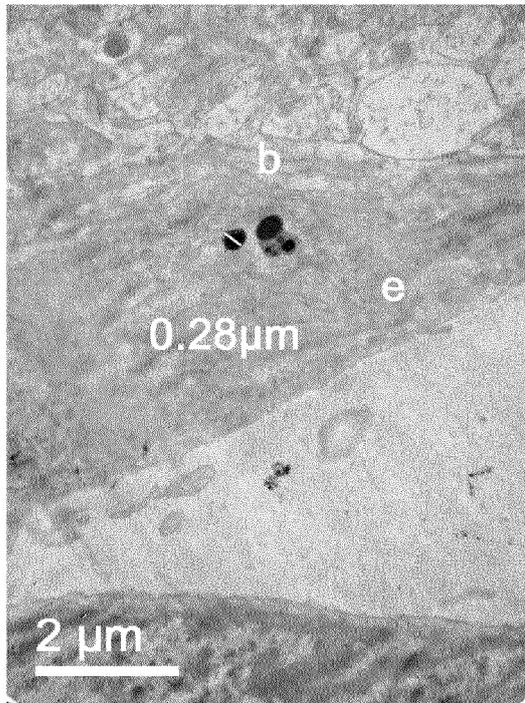


Fig 20

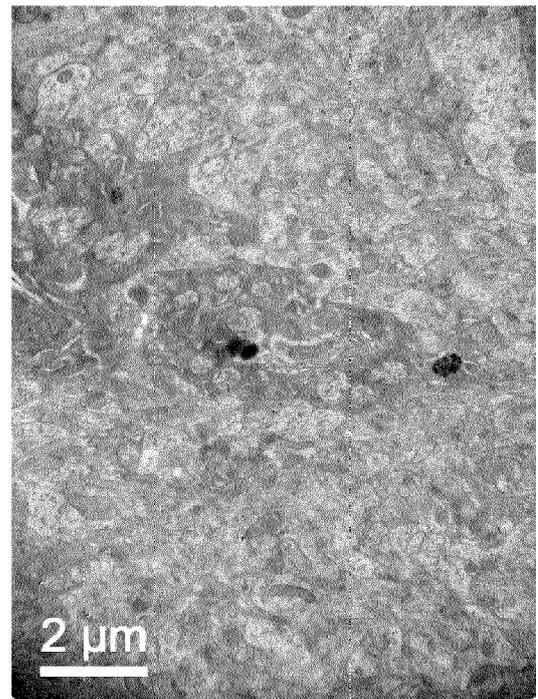
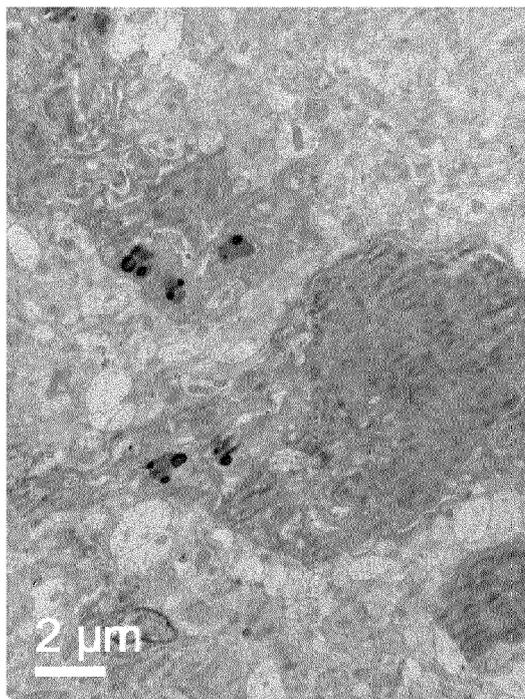


Fig 21

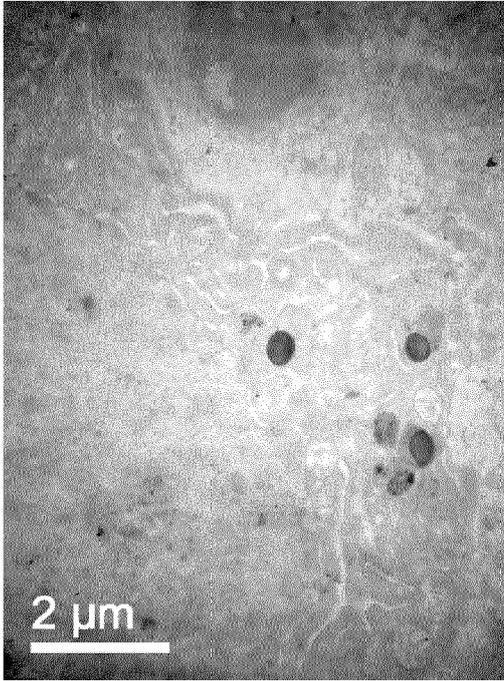


Fig 22

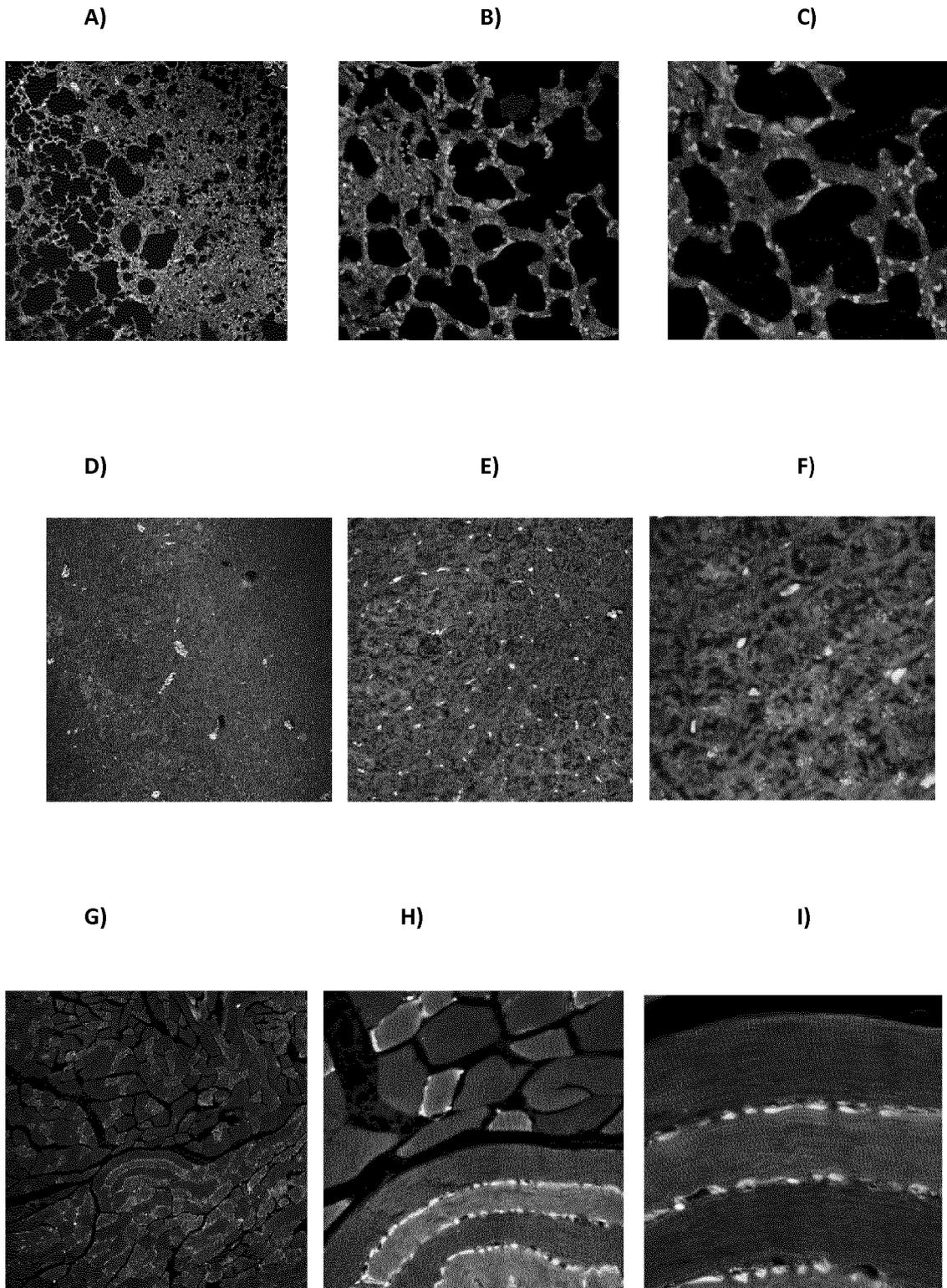


Fig. 23

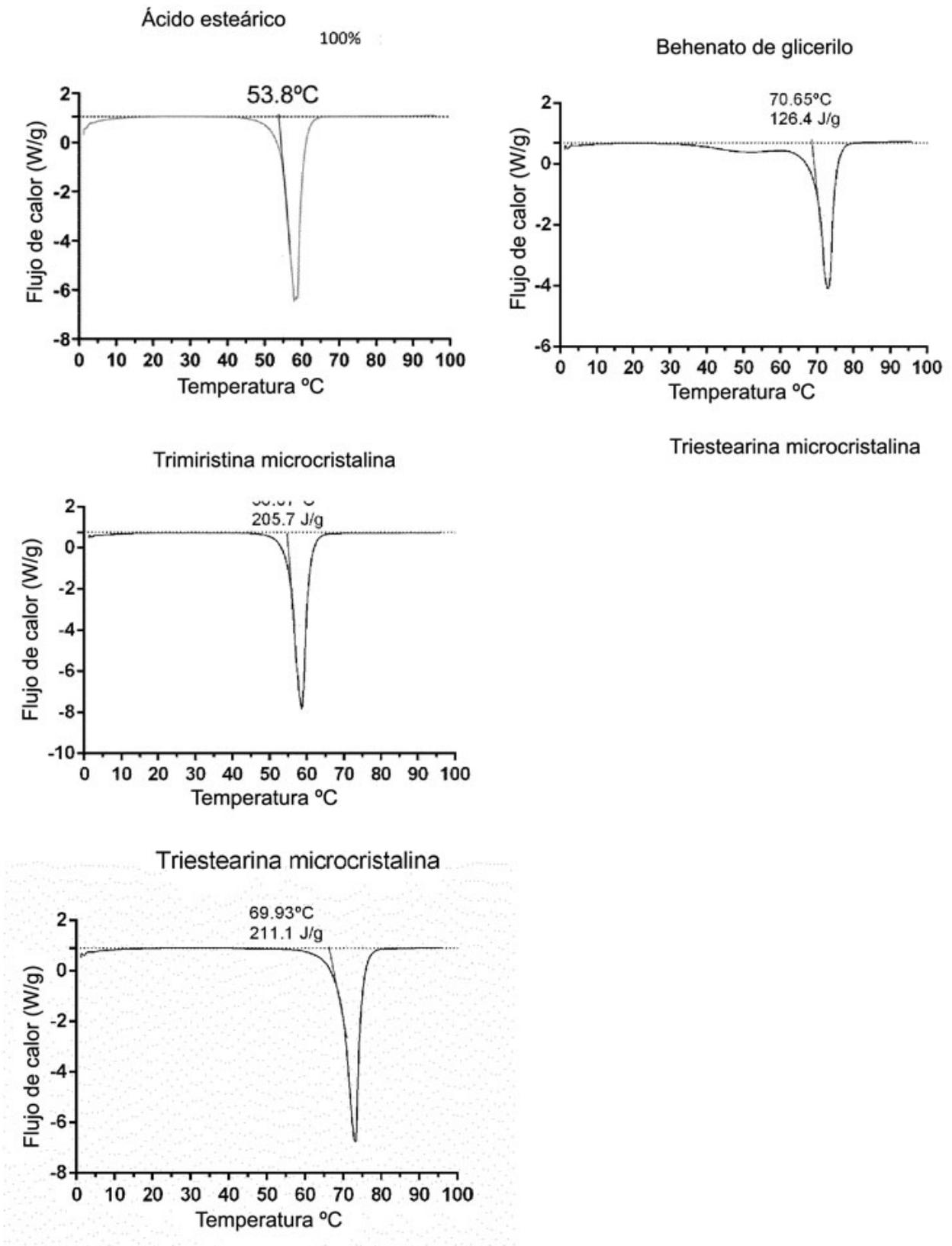


Fig. 24

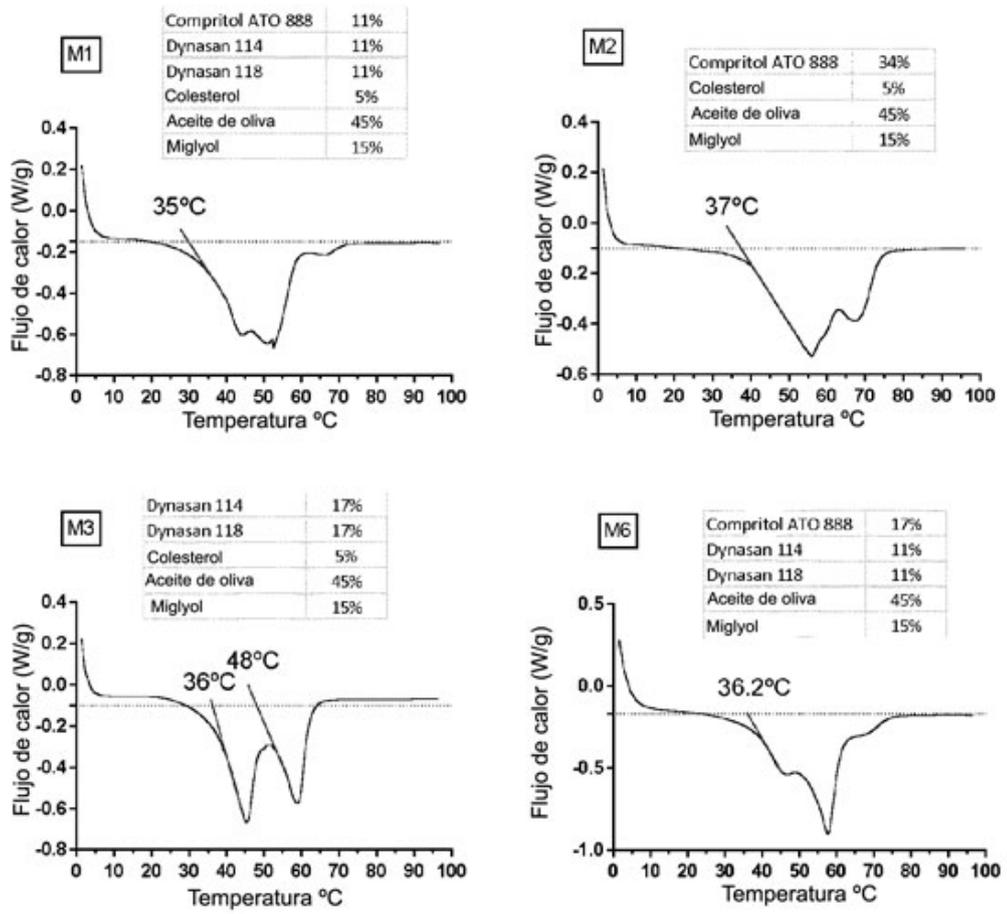


Fig. 25

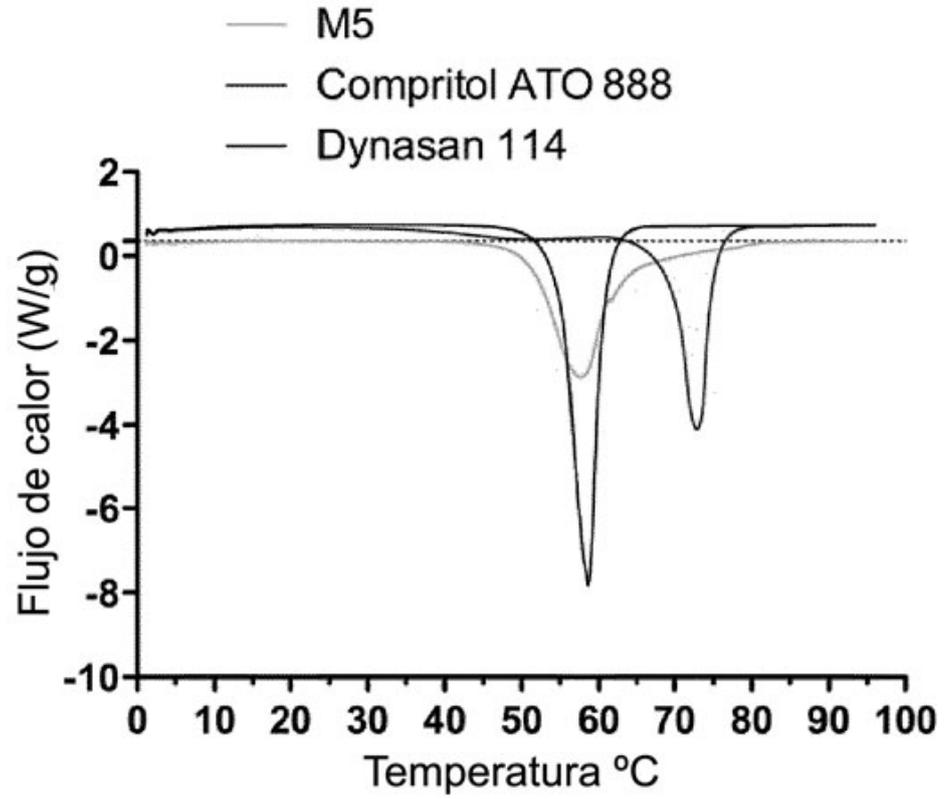
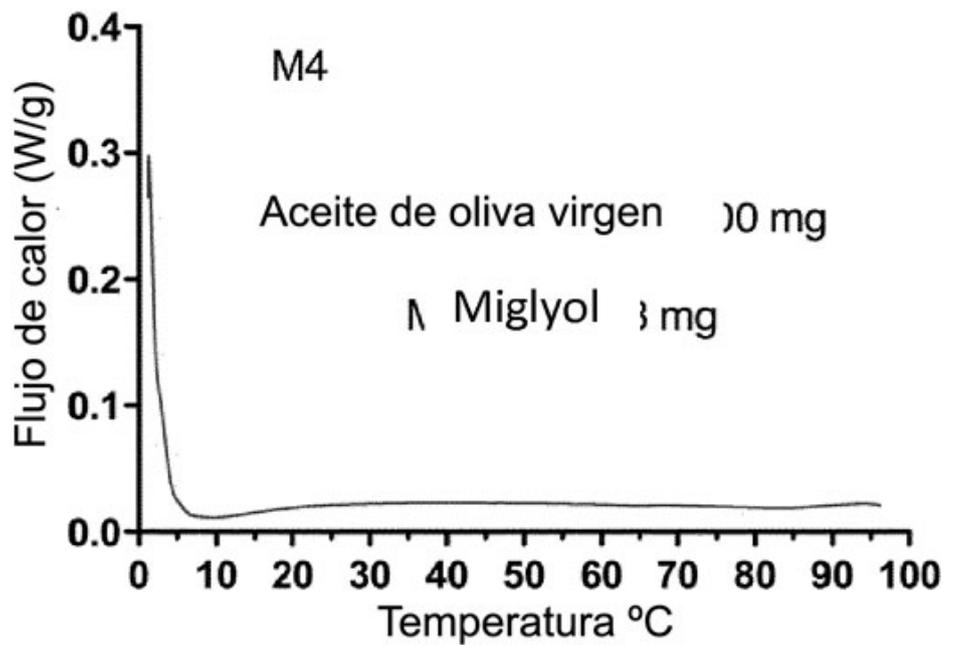


Fig. 26



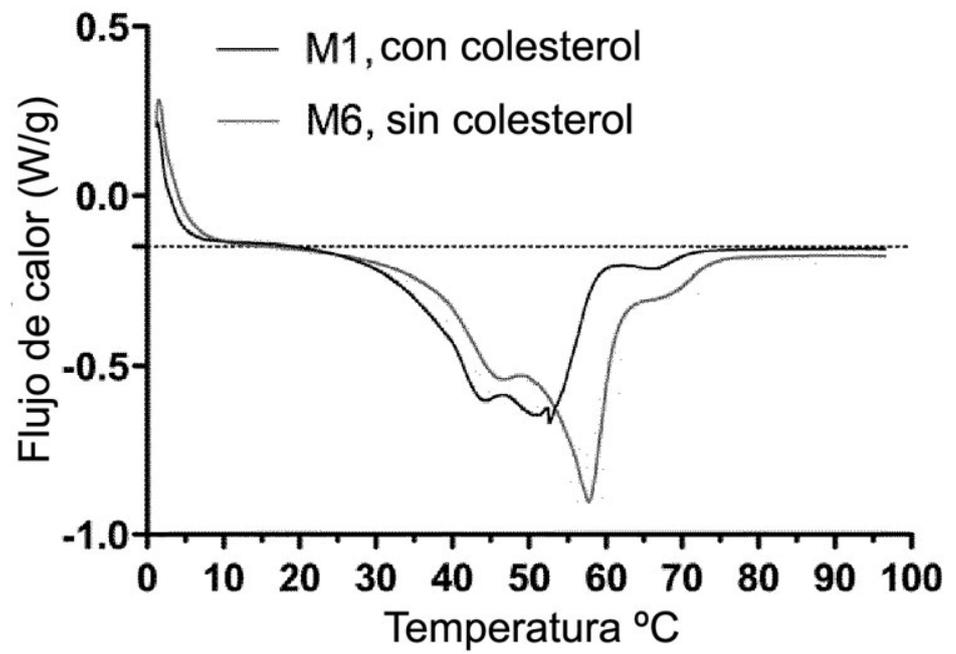
**Fig. 27**

Fig.28

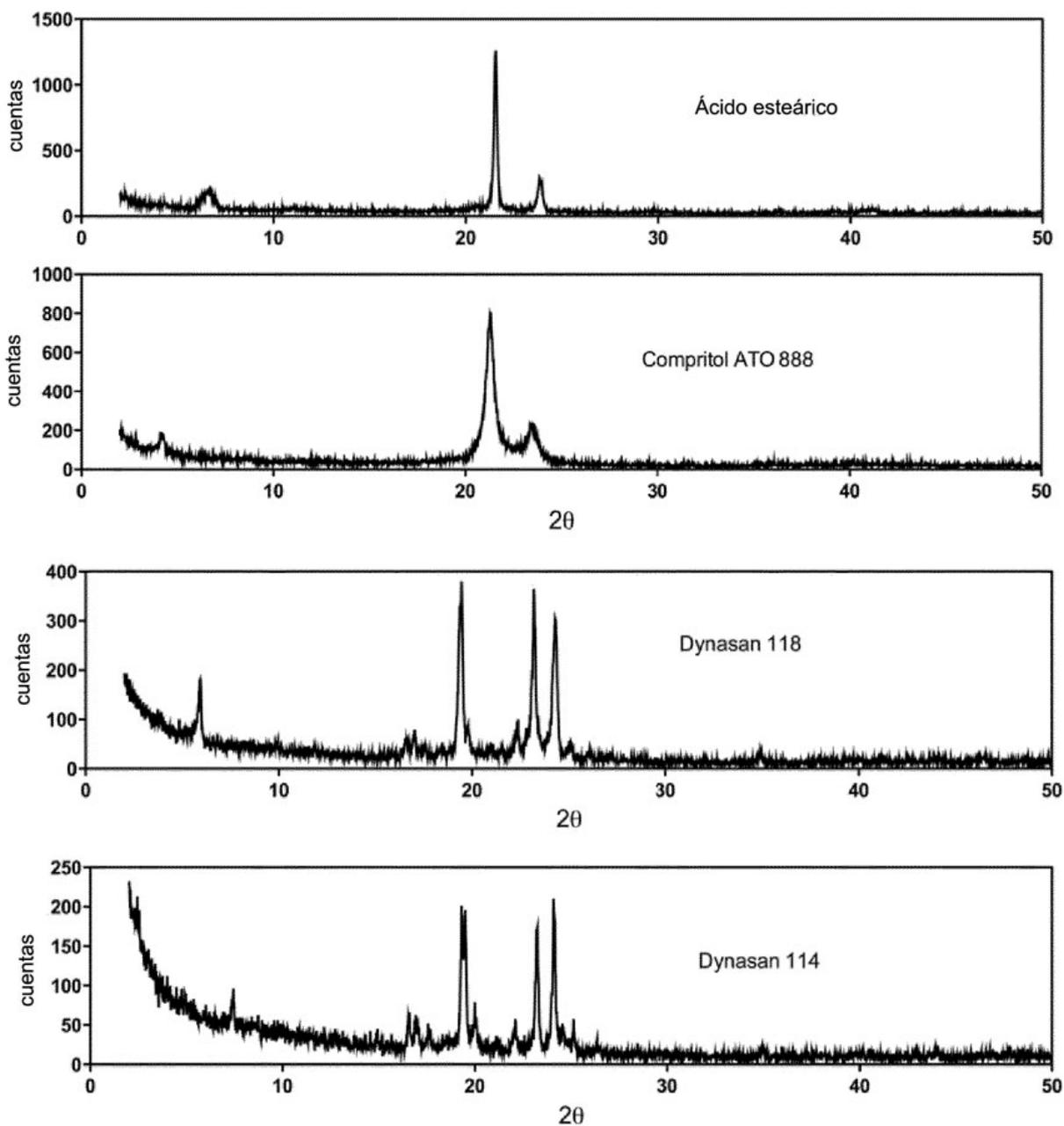


Fig. 29

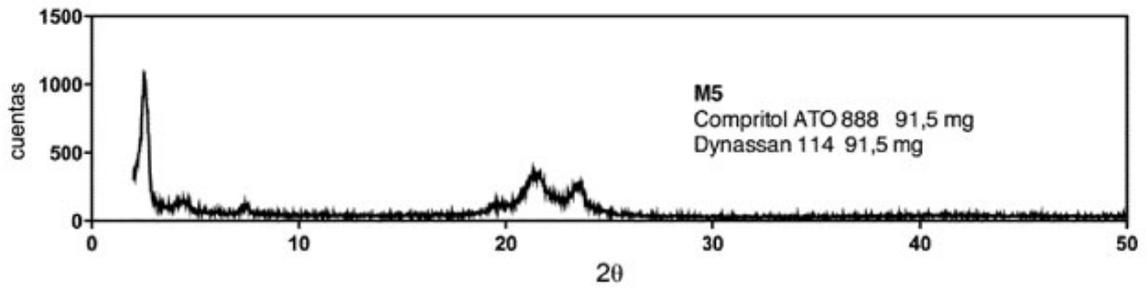


Fig. 30

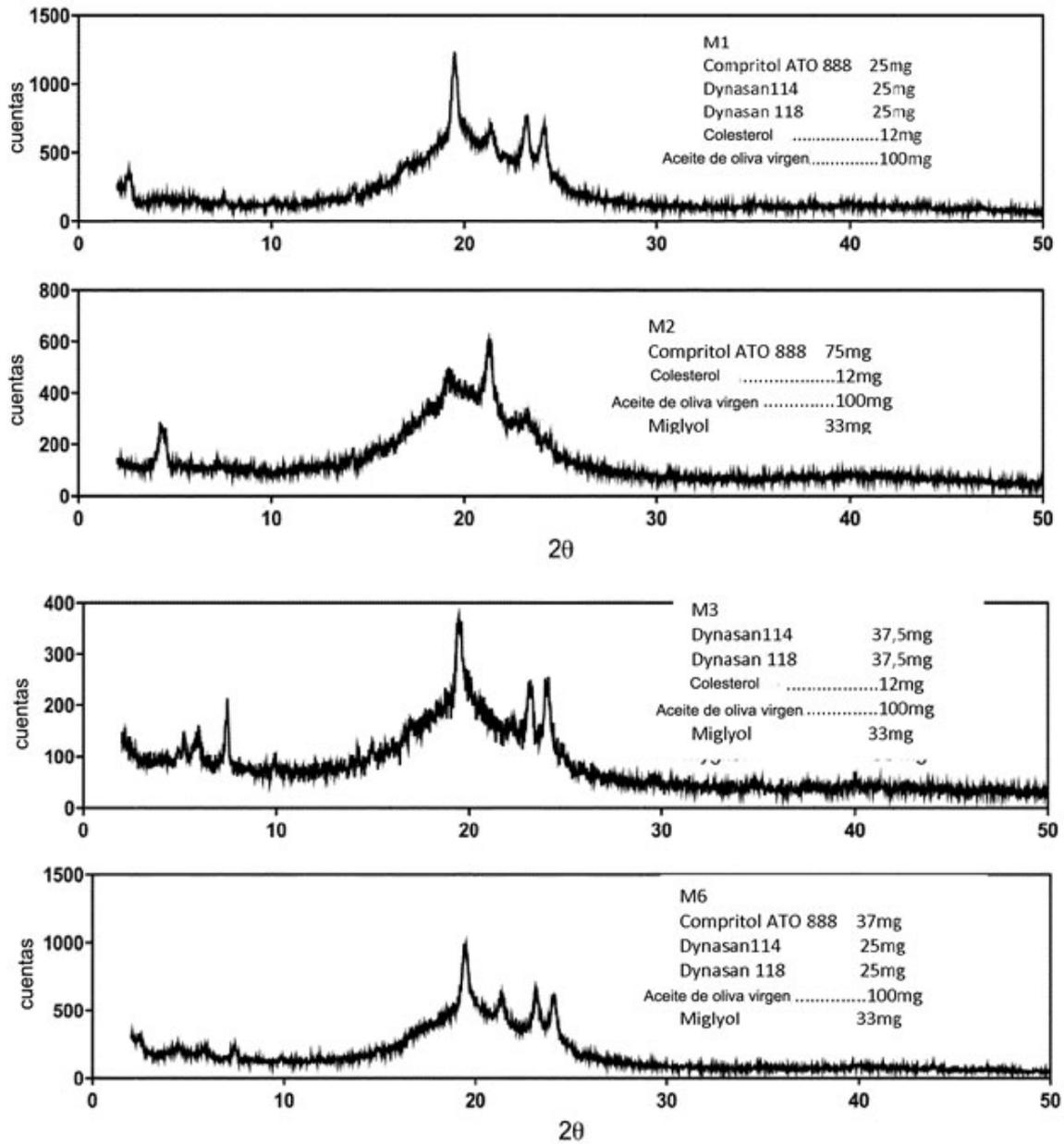


Fig. 31

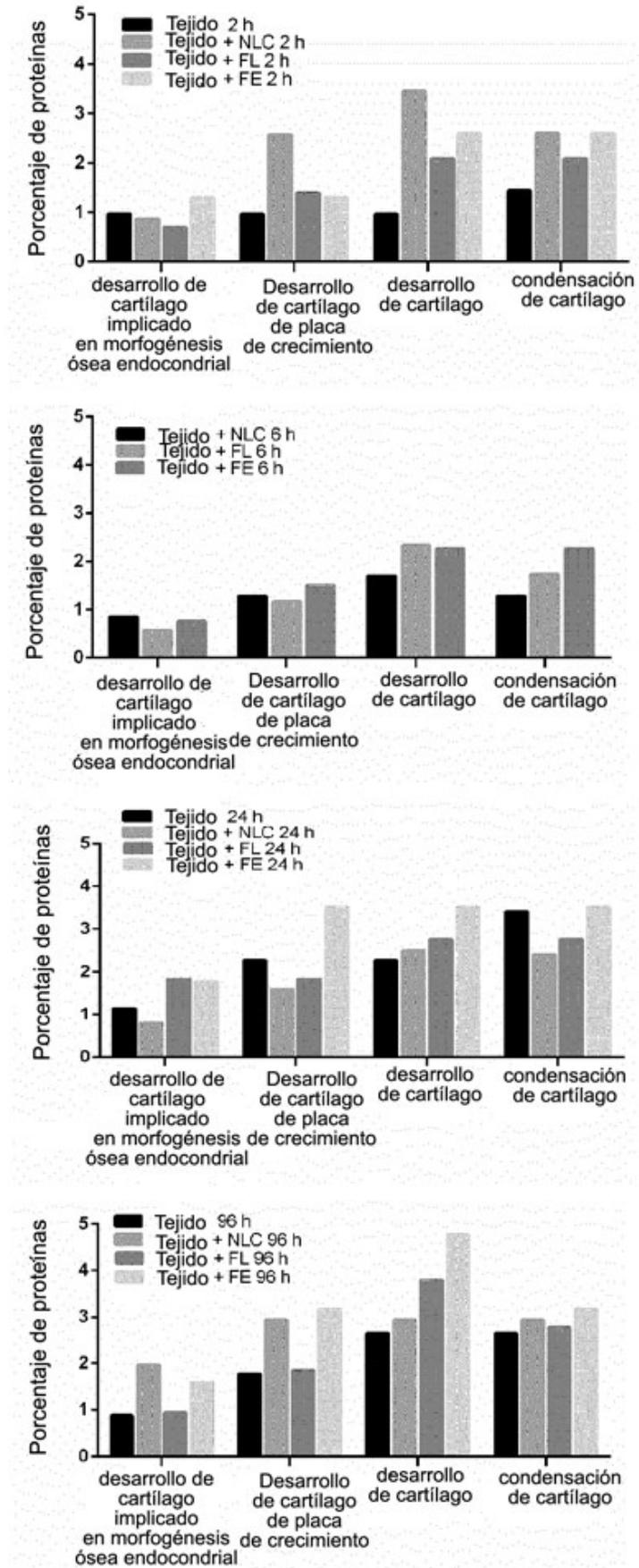


Fig. 32

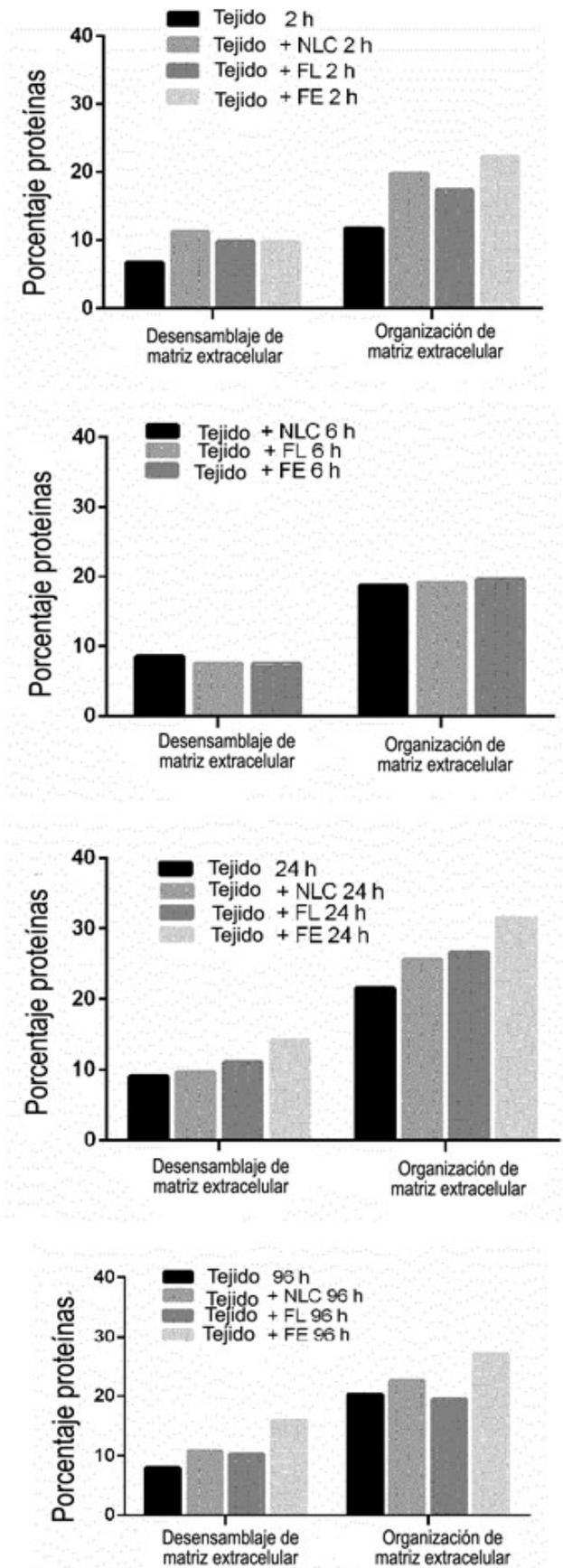


Fig. 33

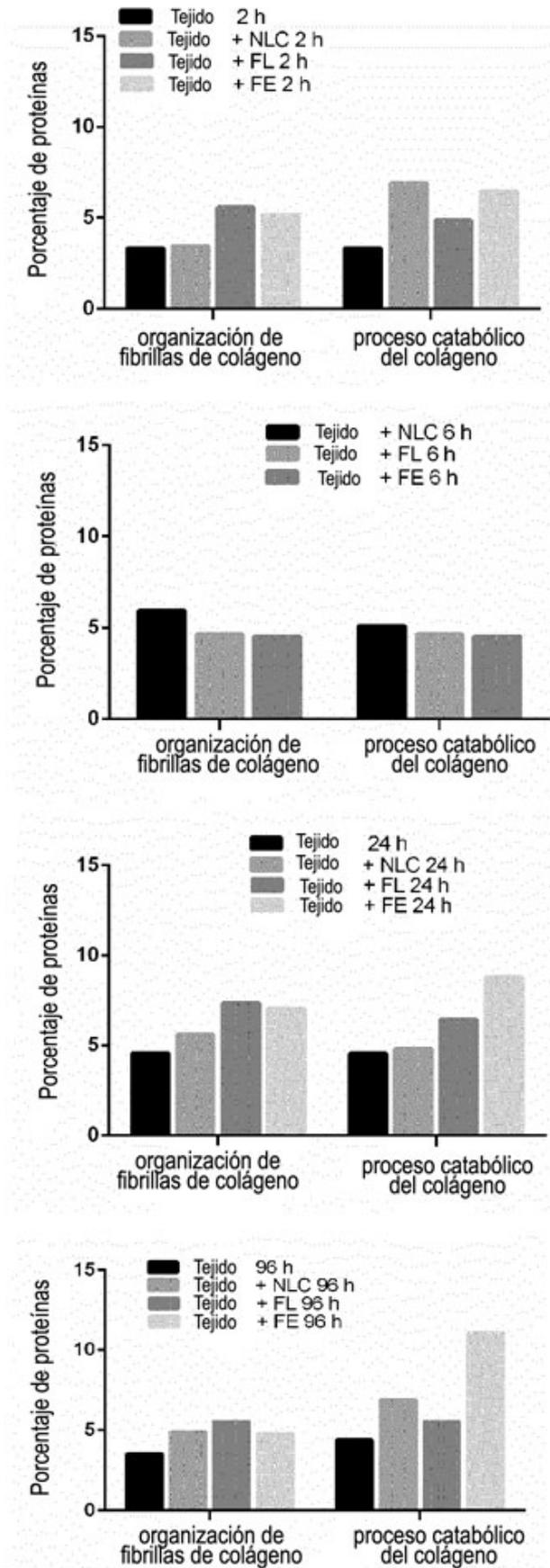


Fig. 34

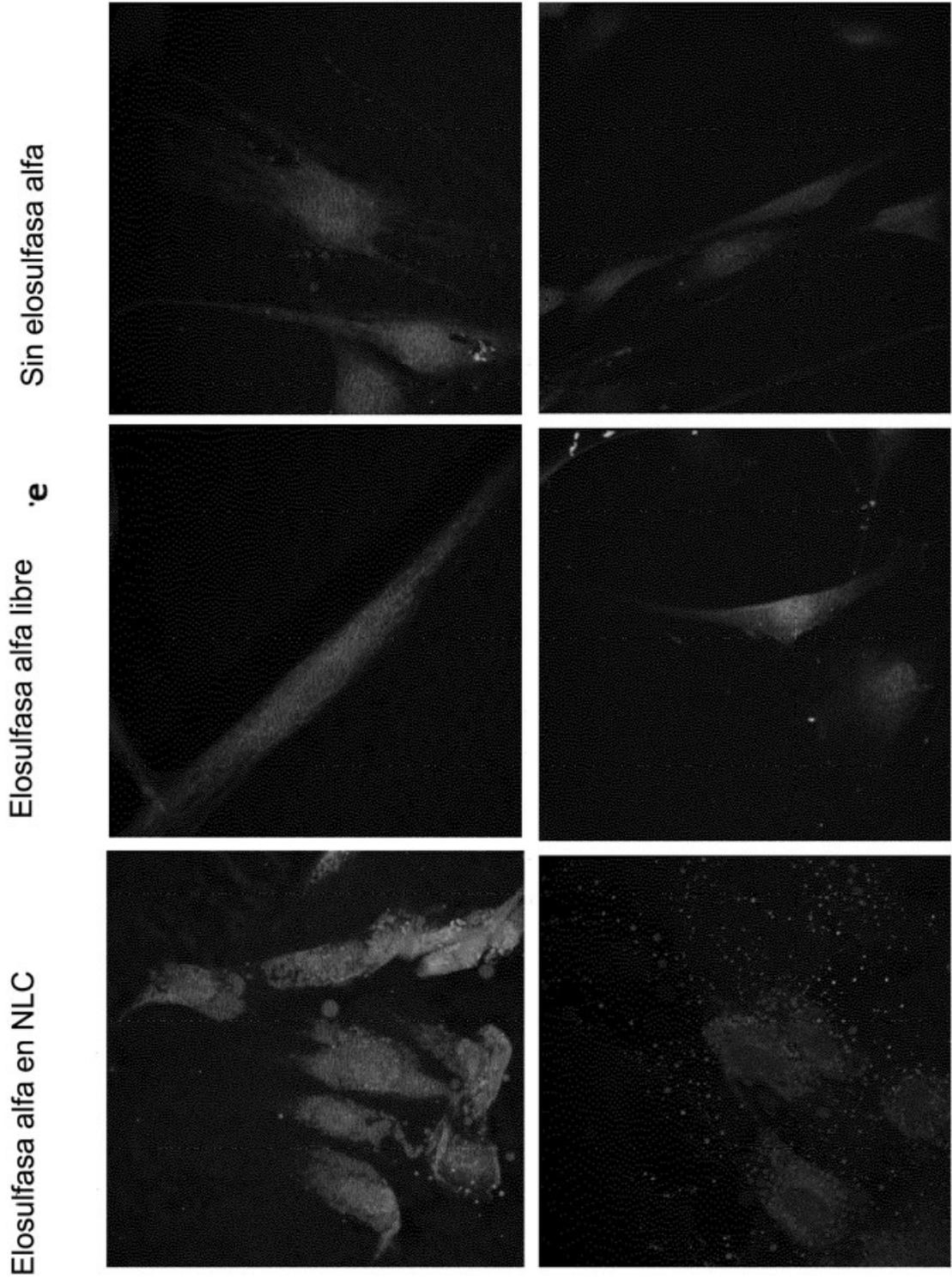


Fig. 35

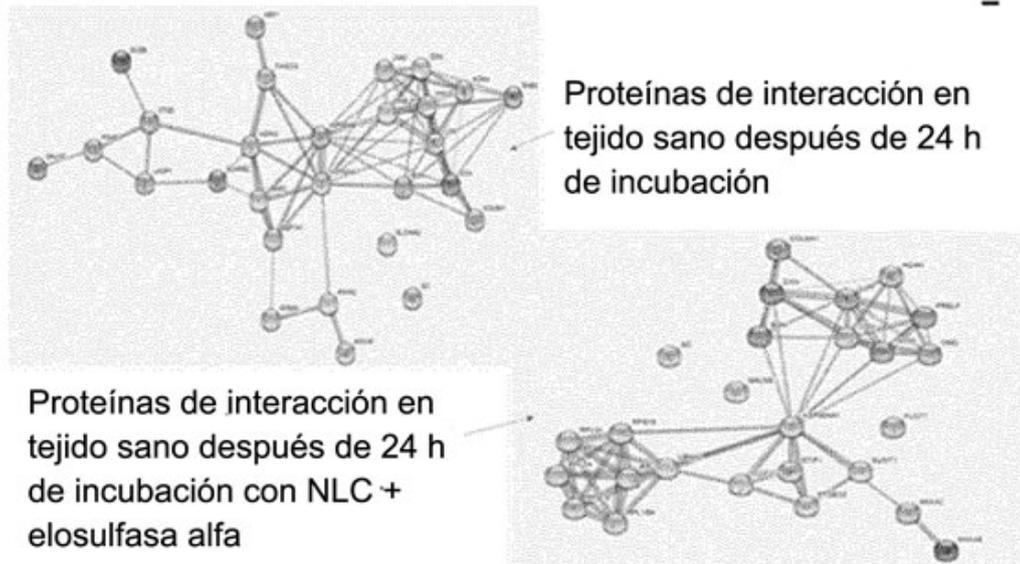


Fig. 36

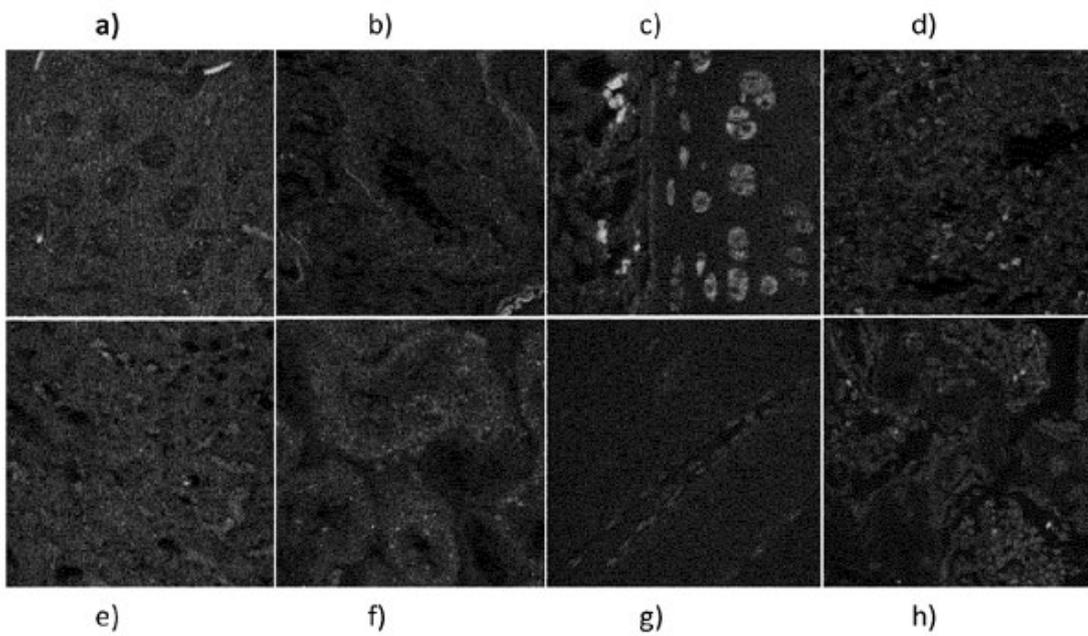


Fig. 37

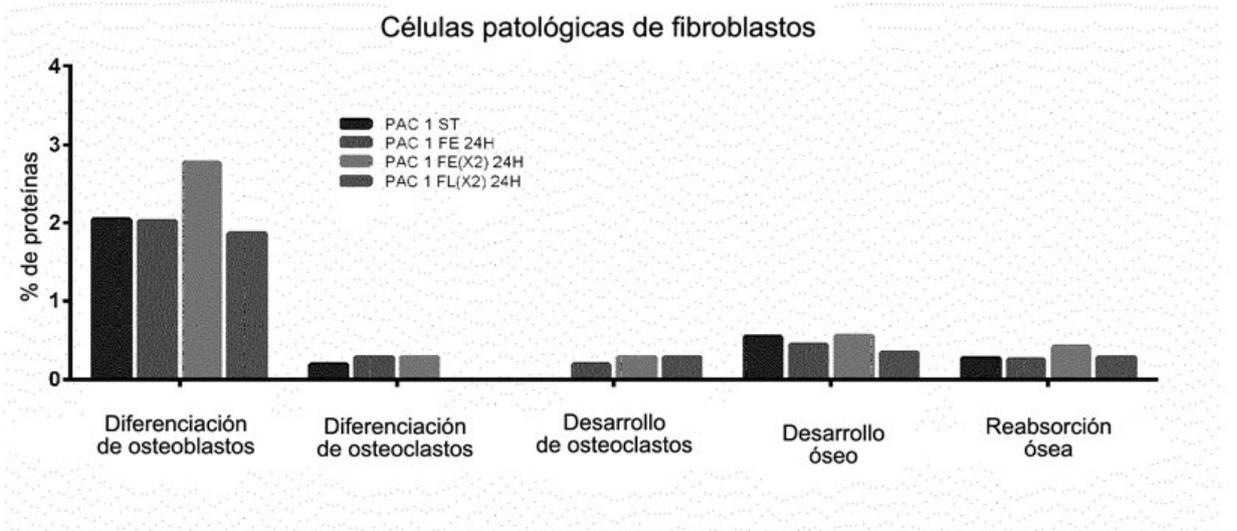
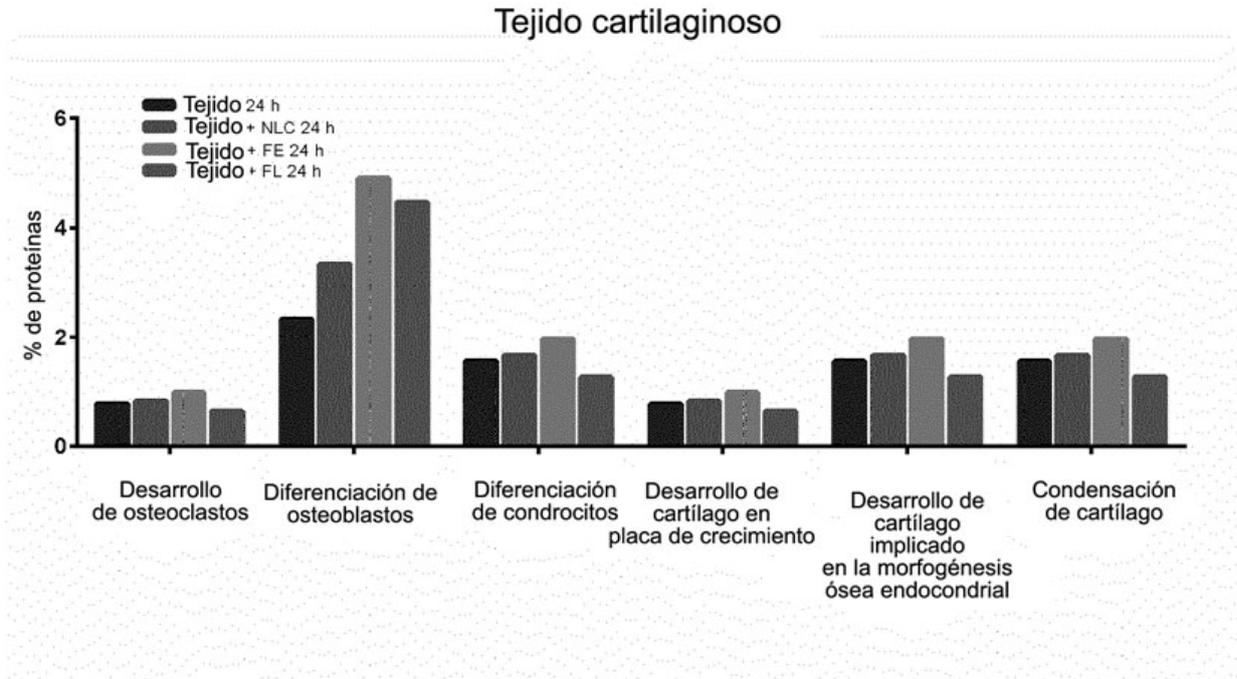


Fig. 38

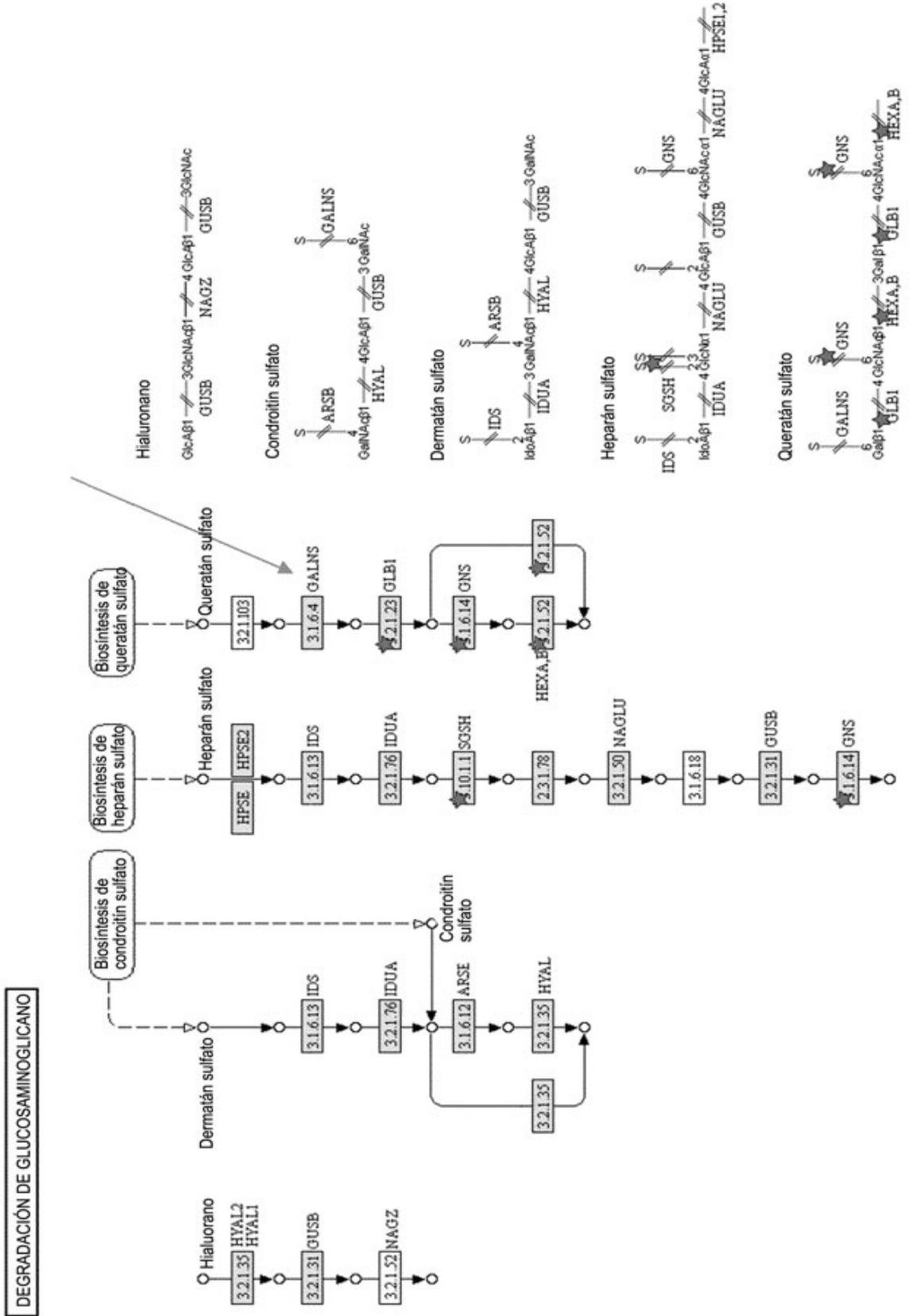


Fig. 38 (cont.)

