

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 550**

51 Int. Cl.:

A61K 47/22	(2006.01)	A61K 49/08	(2006.01)
A61K 31/355	(2006.01)	A61K 49/18	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	A61K 38/17	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)		
A61K 47/18	(2007.01)		
A61K 47/24	(2006.01)		
A61P 27/00	(2006.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61K 47/28	(2006.01)		
A61K 49/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2010 PCT/GB2010/000595**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10109212**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2010 E 10723263 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020 EP 2411052**

54 Título: **Vehículo que comprende un derivado de vitamina E y anexina V**

30 Prioridad:

27.03.2009 GB 0905348

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2021

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (100.0%)
The Network Building, 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**CORDEIRO, FRANCESCA;
MOSS, STEPHEN;
COXON, KATY y
DUGGAN, JAMES**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 837 550 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

Vehículo que comprende un derivado de vitamina E y anexina V

Sector técnico de la invención

5 La invención se refiere a un vehículo para la administración de un fármaco u otros agentes al ojo y al sistema nervioso central.

Antecedentes de la invención

10 La administración tópica de fármacos al ojo siempre ha sido una vía de administración atractiva pero no se ha logrado encontrar del todo vehículos que puedan superar con eficacia las barreras físicas y fisiológicas para que un fármaco alcance los segmentos anterior y posterior del ojo. En su anterior solicitud de patente, WO 2009/077769, los inventores describieron los problemas que encontraron al usar gotas oftálmicas que eran la vía normal de administración tópica de fármacos al ojo. Además, los inventores proporcionaron un vehículo para su uso en la administración tópica de fármacos que permite la introducción de fármacos en los segmentos posteriores del ojo, sin necesidad de una administración invasiva directa. Otra solicitud de patente anterior de los inventores, WO 2009/077750, describe el uso de anexina V para vigilar la muerte celular de las células de la retina. El uso de anexina marcada/conjugada para 15 dirigirla a células necróticas también se conoce por WO 2004/006963. La bungarotoxina α se ha utilizado para marcar las capas vasculares de la retina como se describe en Giulian Brain Research, 189:135-155, 1980.

20 Ha habido una mayor demanda de sistemas de administración no invasivos con el advenimiento de tratamientos dirigidos al FCVE (factor de crecimiento vascular endotelial) en afecciones cegadoras como la DMS (degeneración macular senil) y la RD (retinopatía diabética), que actualmente utilizan inyecciones intraoculares (intravítreas) como vía de administración. Con las crecientes tasas de enfermedades y diabetes asociadas al envejecimiento, la necesidad de tratamientos está aumentando drásticamente, especialmente aquellos que no sean invasivos y sean fáciles de administrar y baratos. Sería conveniente contar con vehículos mejorados para la administración tópica de productos farmacéuticos para inhibir el FCVE y tratar la DMS, la RD y otras afecciones similares.

25 El desarrollo de tratamientos para el sistema nervioso central (SNC) y el ojo es una de las áreas que más problemas plantea en el desarrollo de fármacos, especialmente con la administración sistémica. Esto se debe principalmente a la barrera hematorretiniana (BHR) en el ojo y la barrera hematoencefálica (BHE) en el SNC. A pesar de los recientes avances, la BHE sigue siendo un verdadero problema al evitar que muchos agentes terapéuticos potenciales lleguen al SNC. El desafío actual es desarrollar sistemas de administración de fármacos que garanticen que los fármacos atraviesen la BHE de una manera segura y efectiva.

30 Los fármacos que hasta ahora se han utilizado en tratamientos del SNC se han visto limitados por tener que ser compuestos pequeños, relativamente liposolubles que atraviesen la BHE por medio de la difusión transmembranaria. Además, al igual que en la enfermedad de Alzheimer, se ha utilizado la inmunización pasiva y activa, pero de nuevo la principal dificultad radica en que los anticuerpos atraviesan mal la BHE, donde particularmente las moléculas de IgG tienen una mala penetración debido a su gran tamaño.

35 Se han descrito liposomas que comprenden fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidilserina para la encapsulación de agentes neoplásicos (WO 00/01366). Se han descrito lípidos y complejos de lípidos y anexinas para el tratamiento de la lesión por isquemia y reperfusión y la lesión por reperfusión (WO 2007/112403). En particular, los complejos incluyen complejos de anexina 4 y liposoma, que pueden incluir tocoferol α . También se han descrito liposomas que comprenden un fosfolípido aniónico, colesterol, un fosfatidilglicerol y tocoferol, y que contienen proteína encapsulada 40 (EP 0740547). La vitamina E, como el TPGS, se ha utilizado en soluciones oftálmicas para solubilizar la ubiquinona Q10 (EP 1464341).

Los inventores han desarrollado vehículos que permiten a los agentes atravesar la BHE y la BHR. Estos vehículos se pueden utilizar en productos farmacéuticos para su administración en una variedad de métodos, tales como administración intravenosa, nasal, transdérmica y tópica.

45 Explicación resumida de la invención

Según la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un derivado de vitamina E, una proteína de unión a fosfolípidos aniónicos, un fosfolípido aniónico y un esteroles, donde el derivado de vitamina E, el fosfolípido aniónico y el esteroles forman un liposoma, y donde el derivado de vitamina E es tocoferol y la proteína de unión a fosfolípidos aniónicos es anexina V.

50 La composición se puede utilizar para transportar carga, tal como compuestos biológicos o farmacéuticamente activos, a regiones del cuerpo de un sujeto. En particular, la composición se puede utilizar para transportar dicha carga a través

de la BHR o la BHE. Por lo tanto, la composición también puede comprender la carga que transportar.

El derivado de la vitamina E, el fosfolípido aniónico y el esteroles forman un liposoma (bicapa lipídica). La proteína de unión a fosfolípidos aniónicos puede unirse a la superficie de la bicapa lipídica. La composición puede comprender otros componentes capaces de formar una bicapa lipídica.

- 5 El término derivado de vitamina E se utiliza en la presente memoria para referirse al tocoferol. Hay 8 moléculas isoméricas de vitamina E: los cuatro tocoferoles poseen una cadena lateral de 4',8',12'-trimetiltridecilitol y los cuatro tocotrienoles difieren por la presencia de enlaces dobles en las posiciones 3', 7' y 11' de la cadena lateral.

La vitamina E se compone de dos series homólogas de tococromanos, denominados "tocóferoles" y "tocotrienoles." En particular, un tocoferol es un mono-, di- o tri-metiltocol, que puede tener actividad de vitamina E. El término es muy conocido en la técnica. También se incluyen en la definición de tocoferol prevista en la presente memoria los derivados de tocoferol, particularmente los derivados funcionales, es decir, aquellos que conservan la función portadora de la molécula original. Un ejemplo de un derivado de tocoferol es TPGS (D- α -tocóferilsuccinato esterificado con polietilenglicol 1000). Un tocotrienol es un tocol con tres enlaces dobles en la cadena lateral, es decir, con tres enlaces dobles adicionales en la cadena fitilica, por lo tanto una 6-(3',7',11',15'-tetrameti-2',6',10',14'-hexadecatetraenil)-1,4-hidroquinona o un 2-metil-2-(4,8,12-trimetiltrideca-3,7,11-trienil)croman-6-ol. Los productos naturales llevan metilos en una o más de las posiciones 5, 7 y 8 del cromanol y, por lo tanto, son idénticos, excepto por la insaturación en la cadena lateral de tipo fitilico, a los tocoferoles; también es análoga la ciclación para formar un derivado de cromanol y la oxidación para formar las tocotrienolquinonas (o cromoenoles). La terminología tocotrienol se utiliza para indicar las relaciones con tocoles y tocoenoles (similar a la vitamina E), la terminología cromanol, para indicar la relación con los compuestos isoprenoidales de la serie de vitamina K y coenzima Q.

Como se indicó anteriormente, el derivado de vitamina E (es decir, tocoferol), el fosfolípido aniónico y el esteroles pueden formar una membrana lipídica (bicapa lipídica) junto con cualquier otro componente formador de bicapa lipídica que pueda estar presente, por ejemplo, fosfolípidos adicionales. La composición molar del derivado de vitamina E se encuentra preferentemente entre el 0,1% y el 20% de los componentes de la bicapa lipídica. Más preferentemente, la composición molar es del 0,1%-15% de derivado de vitamina E, incluso más preferentemente, del 0,1%-10% de derivado de vitamina E, más preferentemente aún, del 0,1%-5% de derivado de vitamina E, incluso más preferentemente, del 0,1%-5% de derivado de vitamina E, más preferentemente aún, del 0,1%-2% de derivado de vitamina E, y más preferentemente, de alrededor del 1% de derivado de vitamina E. En intervalos más bajos de concentraciones, el derivado de vitamina E tiene una capacidad limitada para neutralizar el colesterol oxidado y también una actividad antioxidante reducida. Sin embargo, en los extremos superiores de la escala, interfiere con la fase (orden) de la membrana.

El término proteína de unión a fosfolípidos aniónicos (APLB, por sus siglas en inglés) se conoce en la técnica. Las proteínas APLB pueden ser naturales o pueden ser recombinantes. Las proteínas APLB pueden ser enteras o tal vez un fragmento funcional, es decir, un fragmento o región de la proteína que se une específicamente a las mismas moléculas que la proteína entera. Las anexinas son ejemplos de proteínas APLB. Se encuentra disponible una variedad de anexinas, tales como las descritas en la publicación de solicitud de patente US 2006/0134001A. La proteína de unión a fosfolípidos aniónicos utilizada en las composiciones de la presente invención es la anexina V, que es muy conocida en la técnica. Otras proteínas de unión a fosfolípidos aniónicos incluyen sinaptotagminas, Factor V, Factor VIII y lactadherina.

40 La concentración de proteína APLB se encuentra preferentemente entre 100 $\mu\text{g/ml}$ y 2 mg/ml . Más preferentemente, la concentración de proteína APLB se encuentra entre 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml , incluso más preferentemente, entre 200 $\mu\text{g/ml}$ y 400 $\mu\text{g/ml}$, y más preferentemente, alrededor de 300 $\mu\text{g/ml}$.

La concentración de los componentes de la bicapa lipídica (es decir, tocoferol, fosfolípido aniónico y esteroles junto con cualquier otro componente adicional formador de la bicapa lipídica) es preferentemente entre 0,1 mg/ml y 30 mg/ml , más preferentemente entre 0,1 mg/ml y 20 mg/ml , incluso más preferentemente entre 1 mg/ml y 10 mg/ml , más preferentemente aún entre 3 mg/ml y 7 mg/ml , y más preferentemente alrededor de 5 mg/ml .

El término fosfolípido aniónico (APL, por sus siglas en inglés) también es muy conocido en la técnica. Los ejemplos incluyen fosfatidilserina.

50 Es preferible que durante la preparación de la composición, la concentración de la proteína APLB sea superior a los fosfolípidos aniónicos (APL). La composición se prepara formando liposomas. Cuando los niveles de APL son superiores en comparación con la proteína APLB, no habrá suficiente recubrimiento del liposoma.

La composición molar del APL está relacionada con sus niveles fisiológicos normales en membranas biológicas. Por ejemplo, la fosfatidilserina, un APL, constituye aproximadamente el 10% del contenido de fosfolípidos de las membranas celulares de mamíferos. Por consiguiente, cuando el APL es fosfatidilserina, la composición comprende

preferentemente aproximadamente un 10% de fosfatidilserina. En términos más generales, la composición comprende preferentemente aproximadamente un 10% de fosfolípidos aniónicos. Esta puede estar compuesta por un solo fosfolípido aniónico o puede estar compuesta por más de un fosfolípido aniónico.

5 La composición molar del APL se encuentra preferentemente entre el 1% y 30% de los componentes de la bicapa lipídica, más preferentemente, entre el 5% y 20%, incluso más preferentemente entre el 5% y el 15%, más preferentemente aún, entre el 8% y 12%, y más preferentemente, alrededor del 10%.

10 La composición comprende un esteroles, particularmente colesterol o un componente similar tal como 6-cetocolesterol. La composición molar se encuentra preferentemente entre el 5% y 40% de esteroles, más preferentemente entre el 10% y 30%, incluso más preferentemente entre el 10% y 20%, más preferentemente aún entre el 13% y 17%, y más preferentemente alrededor del 15% con respecto a los componentes de la bicapa lipídica. Preferiblemente el esteroles es colesterol. La cantidad de colesterol utilizada se puede seleccionar para influir en la velocidad de liberación de la carga, con lo que una mayor concentración de colesterol dará como resultado una liberación más lenta de la carga.

La composición porcentual se basa en la composición molar.

15 La composición de la invención se prepara en forma de liposomas, antes de la inclusión de la carga. La carga se encapsula a continuación en la composición liposómica, preferentemente usando electroporación, aunque también pueden ser apropiados métodos alternativos como la congelación y descongelación.

20 La composición de la invención también puede comprender componentes adicionales. En una forma de realización, la composición comprende además un lípido adicional. La composición puede comprender uno o más fosfolípidos adicionales tales como fosfatidilcolina. En una forma de realización, los componentes de la invención comprenden un derivado de vitamina E, tal como tocoferol, un fosfolípido aniónico tal como fosfatidilserina, un esteroles tal como colesterol y otro fosfolípido tal como fosfatidilcolina, donde estos componentes se encuentran en las siguientes proporciones:

25 derivado de vitamina E: 0,1%-20%
 fosfolípido aniónico: 5%-20%
 esteroles: 15%-30%
 fosfolípido: 30%-80%

La invención también proporciona un método para preparar una composición para administrar una carga a un sujeto que comprende

- 30 a) formar liposomas a partir de tocoferol, anexo V, un fosfolípido aniónico, tal como fosfatidilserina, y un esteroles; y
 b) encapsular la carga en la composición liposómica.

Preferentemente, la carga se encapsula estando presente en el momento de la formación del liposoma, o mediante electroporación, congelación y descongelación, sonicación o vórtice. Más preferentemente, la carga se encapsula estando presente en el momento de la formación del liposoma, o mediante electroporación, congelación y descongelación o sonicación.

35 Preferentemente, la encapsulación se lleva a cabo cuando la concentración lipídica de los liposomas es relativamente alta. Esto ayuda a aumentar la eficiencia de encapsulación de manera que se encapsule más carga en los liposomas. Preferentemente, la concentración de lípidos es de 10 mg/ml o más, más preferentemente, la concentración de lípidos es de 20 mg/ml o más, incluso más preferentemente, la concentración de lípidos es de 30 mg/ml o más, y más preferentemente, la concentración de lípidos es de 40 mg/ml o más.

40 También se proporciona el uso de una composición de la invención como vehículo para administrar un agente a través de la barrera hematoencefálica o a través de la barrera hematorretiniana.

El término segmento posterior del ojo se refiere a estructuras en la parte posterior del ojo incluidos, por ejemplo, el cristalino, la malla trabecular, la úvea (incluido el cuerpo ciliar), el cuerpo vítreo y la retina. En particular, la invención permite una administración mejorada a la retina.

45 Las composiciones de la invención se pueden utilizar para administrar otras moléculas, agentes o composiciones. Por consiguiente, la composición puede contener además uno o más agentes para administrar (carga). Dichos agentes pueden incluir agentes terapéuticos o biológicamente activos, por ejemplo. Los agentes particularmente preferidos incluyen neuroprotectores (tales como memantina), factores de crecimiento y antagonistas del factor de crecimiento (incluidas moléculas antiangiogénicas), anticuerpos (tales como Lucentis y Avastin), aptámeros (tales como Macugen), esteroides (tales como triamcinolona), agentes moleculares.

50 Se formula una composición farmacéutica de la invención para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los métodos para llevar a cabo la administración son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo,

la administración puede ser intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intravítrea, intracavitaria, subcutánea, intranasal o tópica.

5 Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación intradérmica o subcutánea suelen incluir al menos uno de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua, solución salina, aceites fijos, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); amortiguadores tales como acetato, citrato o fosfato; y agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases. Dichas preparaciones pueden encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de varias dosis.

10 Las soluciones o suspensiones utilizadas para administración intravenosa o intravítrea pueden incluir un vehículo tal como solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CremophorELT™ (BASF, Parsippany, NJ), etanol o polirol. En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida para facilitar la jeringabilidad. La fluidez adecuada a menudo se puede obtener usando lecitina o tensioactivos. La composición también debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La prevención del crecimiento de microorganismos se puede lograr con agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, etc. En muchos casos, se pueden incluir en la composición agentes isotónicos (azúcar), polialcoholes (manitol y sorbitol) o cloruro de sodio. La absorción prolongada de la composición se puede lograr mediante la adición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 La composición farmacéutica según la invención es preferentemente para administración tópica, es decir, preferentemente para su aplicación a la superficie del globo ocular, en forma de gotas oftálmicas u otra forma tópica. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede contener, además, otros soportes, vehículos o excipientes tales como cloruro de sodio, cloruro de benzalconio, fosfato de dihidrógeno de sodio monohidrato, fosfato disódico anhidro y agua para preparaciones inyectables.

25 A continuación se describirá la presente invención en detalle, únicamente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras.

Descripción de los Dibujos

30 Figura 1. Imágenes de Lucentis con 488. La imagen en el punto de partida (marcado a la izquierda) muestra que hay una autofluorescencia inherente débil del 488 con el láser de argón configurado con una intensidad del 95%. La imagen del mismo ojo 40 minutos después de Lucentis tópico marcado con 488 se muestra arriba (marcado a la derecha), con la misma intensidad láser que el registro en el punto de partida. Obsérvese que se ve una fluorescencia mucho mayor - toda la imagen es mucho más brillante. Este cambio en la actividad de fluorescencia refleja un aumento en los fluoróforos 488 en la retina, que solo se puede atribuir al paso de Lucentis marcado con 488 a la parte posterior del ojo. Esto demuestra que Lucentis marcado con 488 ha sido transportado por el vehículo del sistema universal de administración de fármacos (UDDS, por sus siglas en inglés), a través de la córnea, las cámaras anterior y posterior, el cristalino y las estructuras vítreas para llegar a la capa de fibra nerviosa retiniana del ojo.

40 La Figura 2 muestra imágenes de IgG marcada con Cy3. La imagen en el punto partida (marcado a la izquierda) muestra que hay una autofluorescencia inherente débil del 488 con el láser de argón configurado con una intensidad del 95%. La imagen del mismo ojo 1 hora después de IgG tópico marcado con Cy3 se muestra arriba (marcado a la derecha), con la misma intensidad láser que el registro en el punto de partida. Obsérvese que se ve una fluorescencia mucho mayor - toda la imagen es mucho más brillante. Además, se observan áreas focales de hiperfluorescencia (manchas blancas) que indican que la IgG se ha unido a estructuras específicas en la retina. Este cambio en la actividad de fluorescencia solo se puede atribuir al paso de la IgG marcada con Cy3 a la parte posterior del ojo.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la fluorescencia asociada a varias muestras para ultracentrifugación.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la fluorescencia asociada a varias muestras para la exclusión por tamaño.

45 La Figura 5 es un gráfico que muestra el nivel de fluorescencia asociado a varias muestras para encapsulación.

La Figura 6 muestra los perfiles de elución de liposomas y FITC- α BT usando una columna Superdex 75.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la fluorescencia asociada a los perfiles de elución de la Figura 6.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la concentración de fosfato en relación con la absorbancia.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la concentración de fosfatidilcolina en relación con la absorbancia.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la absorbancia asociada a fracciones de 1,5 ml eluidas de las columnas de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés) Superdex 75 y Superdex 200.

5 La Figura 11 muestra los perfiles de elución de liposomas, fluoresceína y α -BT con un desarrollo cromatográfico con columna con gel G-50 grueso. Los perfiles de elución se midieron mediante turbidez a 600 nm y fluorescencia a 488 nm, respectivamente.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la cantidad de proteína total asociada a varias muestras para ultracentrifugación.

La Figura 13 es un gráfico que muestra el efecto en la encapsulación de variar la concentración de lípidos.

10 La Figura 14 es un gráfico que muestra el efecto de la dispersión de la luz debido al aumento de la concentración de lípidos.

La Figura 15 es un gráfico que muestra la fluorescencia para diferentes niveles de fluoresceína con varios detergentes.

La Figura 16 son imágenes del ojo que muestran que la α BT marca específicamente las arterias en la retina.

15 La Figura 17 muestra la liberación satisfactoria de α BT y anexina V-776. (A) demuestra la liberación de anexina en presencia de liposomas y (B) muestra la liberación de α BT encapsulada, mientras que (C) y (D) muestran el efecto de 1 mg/ml de anexina V-776 y 50 μ g/ml de α BT, respectivamente, inyectadas sin la presencia de liposomas.

La Figura 18 es un gel que muestra altos niveles de expresión de anexina V-GST.

20 La Figura 19 muestra que la fluoresceína es incapaz de atravesar una barrera hematorretiniana intacta y permanece aislada en los vasos, como se muestra en la Figura D, E y F. Es importante destacar que los vasos sanguíneos retinianos no se vieron con el material encapsulado (A-C), ya que no tienen (D-F), aunque hay un indicio de fluorescencia de la pared arterial en el ojo tratado encapsulado a los 34 minutos (B). Sin embargo, los ojos tratados con material encapsulado mostraron después de 7 minutos parches focales o manchas de fluorescencia en la retina, como destacan los círculos en la Figura A. La frecuencia de estos parches fluorescentes pareció alcanzar su punto máximo después de 30 minutos, mostrado en la Figura B, antes de comenzar a dispersarse después de 74 minutos, como se muestra en la Figura C.

25 Figura 20. Permeabilidad de fluoresceína de sodio (NaFI) como marcador de la alteración de la BHR en animales hipóxicos a temperatura ambiente y temperatura ambiente alta. Las secciones de ratas de control inyectadas con NaFI no muestran permeabilidad en el tejido cerebral de las cortezas frontal (superior) y parietal (inferior). Por el contrario, las secciones del cerebro de ratas hipóxicas a temperatura ambiente a 1 o 2 días muestran permeabilidades monofocales moderadas en las cortezas frontal y parietal. Las secciones del cerebro de ratas a 1 o 2 días a temperatura ambiente alta más hipoxia muestran múltiples regiones focales de NaFI en el tejido cerebral. Escala gráfica = 100 μ m.

35 Figura 21. Con el fin de evaluar la liberación terapéutica de carga desde liposomas encapsulados a los ojos, se desarrolló un modelo de FCVE utilizando 500 ng por ojo de FCVE humano recombinante (rhVEGF165), que mostró un aumento de la tortuosidad de los vasos sanguíneos (A, imagen reflectante), permeabilidad y engrosamiento de los vasos sanguíneos, visto después de una angiografía con fluoresceína tomada 24 horas después de las inyecciones de FCVE (B, imagen fluorescente). La reversión de estos efectos se logró utilizando inyecciones intravítreas de 2,5 μ l de Lucentis de calidad terapéutica (C-D). El ojo tratado con Lucentis muestra un tamaño de vaso reducido a normal (C, imágenes reflectantes), sin permeabilidad y anatomía vascular normal (D, imagen fluorescente) en relación con el modelo de FCVE sin tratar.

40 La Figura 22 es una serie de imágenes que son angiogramas de fluoresceína tomados a las 24 (A, C) y 48 (B, D) horas de los ojos izquierdos tratados con FCVE intravítreo. En primer lugar, es obvio que el tratamiento simultáneo de Lucentis con FCVE indujo a las 24 horas grandes cambios inflamatorios incluyendo permeabilidades, tortuosidad y engrosamiento de vasos (A, C) extensos. Sin embargo, a las 48 horas hay una gran diferencia con el animal tratado con Lucentis encapsulado (B) que no muestra áreas de permeabilidad focal, sino una vasculitis (flebitis), en comparación con fugas masivas, neovascularización y hemorragia en el animal tratado con Lucentis de calidad clínica intravenoso.

Figura 23. El ojo tratado con Lucentis encapsulado muestra tortuosidad reducida, tamaño de vaso reducido a normal (A, imagen reflectante), sin fugas y anatomía vascular más normal (B, imagen fluorescente).

50 La Figura 24 es una serie de imágenes que provienen de regiones similares del cerebro de un animal con fluoresceína sódica encapsulada intravenosa (A-B) en comparación con una fluoresceína sódica intravenosa simple (C-D). Se

muestran las imágenes tanto de fluorescencia (A, C) como de transmisión (B, D). Obviamente, solo el material encapsulado muestra fluorescencia (A) sin ninguna señal en absoluto en el cerebro tratado con fluoresceína sódica intravenosa simple (C).

Descripción detallada de la invención

5 EJEMPLOS

Mecanismo de transporte

10 Las barreras físicas como el epitelio corneal y el endotelio de las barreras hematoencefálica y hematorretiniana se componen de láminas de células estrechamente adheridas. Las uniones entre células (ya sea corneales o de la BHE) están reguladas por complejos de proteínas que forman uniones estrechas que restringen el movimiento de compuestos. La selectividad de estas uniones depende del tipo específico de tejido epitelial, pero generalmente solo los fármacos hidrófilos o iones de bajo peso molecular (100-200Da) son capaces de utilizar la vía paracelular. Los fármacos lipófilos son capaces de penetrar a través del endotelio de la BHE, pero su tránsito sigue restringido a moléculas <400Da. En la córnea, el estroma ofrece una barrera adicional a los fármacos lipofílicos, evitando su penetración en la parte posterior del ojo.

15 La transcitosis permite el transporte selectivo de moléculas a través del epitelio. Se propone que sea el mecanismo por el cual grandes complejos moleculares e incluso virus, que muestran similitudes (estructuras encerradas de fosfolípidos de 100 nm) con los liposomas utilizados, son capaces de cruzar el epitelio.

20 La transcitosis se produce a través de fosas recubiertas de clatrina o invaginaciones en forma de bolsas presentes en la superficie del tejido epitelial, llamadas caveolas. Las fosas recubiertas de clatrina dependen de la endocitosis mediada por el receptor, mientras que las caveolas están mediadas por el colesterol y la proteína membranaria, la caveolina. La naturaleza esencial del colesterol en las caveolas se correlaciona bien con la dependencia del esteroles observada en el sistema portador.

25 Sin limitarse a una teoría particular, los inventores creen que la composición de la invención podría estar estimulando/utilizando la vía de la transcitosis caveolar para cruzar células epiteliales y endoteliales. También se ha propuesto que la presencia de colesterol oxidado se opone a la función del colesterol normal e inhibe la función de las caveolas, mientras que la presencia de derivados de la vitamina E neutraliza el efecto inhibitor del colesterol oxidado. La hipótesis está respaldada además por informes recientes que identifican la anexina V como una proteína asociada a las caveolas.

Cruce de la BHE

30 El mercado mundial de fármacos contra encefalopatías es un campo subdesarrollado debido principalmente a que la gran mayoría de los fármacos no atraviesan la BHE *in vivo*, y los que lo hacen, se limitan a moléculas pequeñas con alta solubilidad lipídica y una masa molecular baja de < 400-500 Daltons (Da).

35 El número de moléculas pequeñas que tienen estas propiedades químicas es <2% de todos los fármacos. Otros fármacos no atraviesan la BHE. Sin soluciones para la BHE, >98% de todos los fármacos que potencialmente podrían tratar encefalopatías no se desarrollan. Esto ha supuesto un revés en trastornos graves como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, lesión cerebral y de la médula espinal, cáncer cerebral y esclerosis múltiple, con una escasez de nuevos fármacos que incluyan agentes neuroprotectores. La capacidad de transportar moléculas grandes también permitiría la administración de proteínas recombinantes, anticuerpos y moléculas de ARN/ADN a sitios diana dentro del SNC.

40 Al reconocer que la BHE es un problema, se han utilizado muchas estrategias para administrar un compuesto de la sangre al cerebro. Estas incluyen estrategias basadas en neurocirugía - muy invasivas, a través de infusión intracerebroventricular o implantes intracerebrales, y una interrupción temporal de las uniones estrechas del endotelio vascular mediante la infusión de soluciones hipertónicas o también se han utilizado agentes biológicamente activos como la bradiquinina, pero son problemáticos - con riesgos de infección y cambios neuropatológicos. Se ha sugerido que, para permitir el transporte a través de la BHE, se puede utilizar la lipidación a través de la conjugación de grupos funcionales polares en un fármaco hidrosoluble con fracciones liposolubles, o un vehículo de fármaco liposoluble, o una reformulación de fármaco para crear un profármaco liposoluble.

50 La composición de la invención se puede utilizar para transportar agentes neuroprotectores y otros agentes activos a través de la BHE.

Método de producción de la composición.

Preparación de liposomas

Los liposomas se prepararon mediante el método de rehidratación de la película lipídica. Los lípidos de interés (fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), colesterol y tocoferol α), disueltos en cloroformo:metanol (5:1 v/v), se mezclaron en cantidades apropiadas antes de retirar el disolvente con flujo constante de nitrógeno. Se demostró que el intervalo de trabajo era de 15%-30% de colesterol (prefiriéndose un 15%), 5%-20% de PS (prefiriéndose un 10%) y 0,1%-20% de derivado de vitamina E (prefiriéndose un 1%), componiéndose el resto de PC. La película lipídica posterior se rehidrató en el volumen apropiado de amortiguador (PBS \pm fluoróforos/carga). Se preparó una concentración matriz de 52 mM de liposomas que posteriormente se diluyó a 6,5 mM para su uso en el UDDS.

Marcado fluorescente de Lucentis o cualquier proteína

Lucentis (ranibizumab) es un fragmento de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular A (FCVE A) humanizado. La naturaleza proteica del anticuerpo permite la conjugación de un tinte fluorescente con aminoácidos específicos. El Lucentis (10 mg/ml) se lavó en 0,1 M de amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 8,3, y se concentró a aproximadamente 2 mg/ml. La reacción de marcado se realizó a temperatura ambiente usando 100 μ g de alexafluor-488 (éster de succinimidilo, disuelto en DMSO) marcando la proteína en cualquier sitio de amina primaria (residuos de lisina y extremo N). Como el fármaco aún está protegido por derechos de patente y la secuencia de aminoácidos de la proteína no está disponible al dominio público, se desconoce el número de grupos de aminas primarias disponibles para el marcado. El tinte no conjugado se eliminó mediante filtración en gel y el Lucentis marcado se eluyó en 1x PBS, pH 7,4. El análisis de la proteína por espectroscopia arrojó los siguientes resultados.

Los picos a 280 nm (0,215 UA) y 488 nm (0,128 UA) indicaron un nivel adecuado de marcado. Sin embargo, la concentración de proteína real y la estequiometría del marcado no pudieron establecerse debido a la falta de información de la secuencia.

Encapsulación por electroporación (método preferido)

Para determinar si el fármaco se puede administrar en la parte posterior del ojo usando la composición, el exceso de Lucentis-488 se encapsuló por la composición usando el proceso de electroporación. El método normal de encapsulación, congelación/descongelación, había conducido previamente a la desnaturalización de la proteína. Se añadieron 15 μ l de Lucentis a 50 μ l de composición y se transfirieron a una cubeta Gene Pulser con ranura de 0,1 cm, generalmente utilizada para la transformación de células bacterianas y de mamíferos. La cubeta se sometió a un pulso eléctrico utilizando un pulsador BioRad GenePulser en las siguientes condiciones: 2,5kV, 25 μ F y 200 Ω . En un uso normal, el pulso eléctrico permite que pequeñas moléculas (comúnmente ADN plasmídico) atraviesen la membrana fosfolípida de las células. Se consideró probable que el método fuera un método de encapsulación alternativo a la congelación/descongelación satisfactorio, ya que los liposomas tienen similitudes estructurales con las membranas celulares.

Encapsulación por congelación y descongelación

La encapsulación mediante congelación/descongelación se realizó congelando el vehículo, en presencia de la carga, en nitrógeno líquido y luego descongelando rápidamente la muestra bajo un flujo constante de agua caliente. El proceso se repitió 10 veces para proporcionar una encapsulación óptima en una escala de tiempo razonable. El proceso funciona bien para moléculas simples, pero puede ser desnaturizante para las moléculas complejas como las proteínas.

Eliminación de fluoróforos no incorporados

Los fluoróforos no incorporados se eliminaron mediante ultracentrifugación durante 45 minutos a 60.000 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en PBS fresco.

Adición de proteínas de unión a fosfolípidos aniónicos

Antes de la administración, los liposomas cargados se mezclaron con la proteína de unión a fosfolípidos aniónicos anexina V para lograr una concentración final de 5 mg/ml de liposomas y 300 μ g/ml de anexina V. La variación de las concentraciones de los liposomas y anexina se puede utilizar para lograr diferentes niveles de administración. Se puede utilizar una concentración máxima de 2 mg/ml de anexina debido a problemas de estabilidad, mientras que las dosis de liposomas superiores a 20 mg/ml aumentarían las embolias.

Toma de imágenes *in vivo*

Se obtuvieron imágenes de animales anestesiados (ratas Dark Agouti) utilizando un oftalmoscopio láser de barrido confocal (cSLO, por sus siglas en inglés). Se tomó una imagen de fluorescencia de cada animal en el punto de partida. En pocas palabras, el animal se colocó ante el cSLO para tomar una imagen del interior del ojo. Se enfocó un láser de argón con una longitud de onda de 488 nm en un pequeño punto y se escaneó a través de la retina por un par de espejos para excitar los fluoróforos a esa longitud de onda. La fluorescencia resultante se enfoca ópticamente en una abertura confocal que tiene el efecto de excluir la fluorescencia no deseada en planos por encima o por debajo del plano de profundidad de interés. La toma de imágenes se realizó en el plano de la capa de fibras nerviosas de la retina. Por lo tanto, la imagen en el punto de partida registra solo una autofluorescencia inherente de 488, con el láser

de argón configurado a una intensidad del 95%.

Después de registrar la imagen en el punto de partida, se administraron tópicamente 10 µl de Lucentis encapsulado marcado con 488 en el ojo de las ratas. 40 minutos después del tratamiento tópico, se volvió a tomar imágenes del ojo con los mismos ajustes que en el punto de partida, es decir, una longitud de onda del láser de argón de 488 nm con una intensidad del 95%. La imagen tomada entonces registra una autofluorescencia inherente de 488 (como el punto de partida) MÁS cualquier Lucentis marcado con 488 que alcance el plano de la capa de fibras nerviosas de la retina.

Toma de imágenes de IgG marcada con Cy3

Después de registrar una imagen en el punto de partida, se administraron tópicamente 10 µl de IgG marcado con Cy3 encapsulada en el ojo de las ratas. Cy3 es un tinte fluorescente muy conocido que se puede detectar después de la excitación con láser de argón. Una hora después del tratamiento tópico, se volvió a tomar imágenes del ojo con los mismos ajustes que en el punto de partida, es decir, una longitud de onda del láser de argón de 488 nm con una intensidad del 95%. La imagen tomada entonces registra una autofluorescencia inherente de 488 (como el punto de partida) MÁS cualquier IgG marcada con Cy3 que alcance el plano de la capa de fibras nerviosas de la retina.

Este resultado ilustra el potencial del sistema para administrar anticuerpos funcionales a la parte posterior del ojo, demostrando así potencial en la administración de agentes terapéuticos derivados de anticuerpos.

A. Desarrollo de la tecnología del sistema universal de administración de fármacos (UDDS)

1. Refinamiento del UDDS para administrar carga

Los componentes para la administración satisfactoria de carga incluyen derivados de vitamina E, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, colesterol y anexina. En el refinamiento del proceso para permitir diferentes relaciones de carga/constituyente, se optimizaron los métodos de purificación y encapsulación como se describe a continuación:

(i) Eliminación de material no incorporado

El principal desafío para evaluar la encapsulación satisfactoria es producir métodos fiables y eficientes para la eliminación de material no incorporado. Se han seleccionado varios métodos, que se describen a continuación.

a) Ultracentrifugación

La ultracentrifugación de liposomas a 60.000 g hará que los liposomas se sedimenten, arrastrando cualquier material encapsulado con ellos. Sin embargo, las moléculas individuales son incapaces de sedimentarse a esta velocidad y permanecen en el sobrenadante. El sobrenadante se retira y el sedimento se resuspende en amortiguador fresco. Este proceso de lavado de la muestra se repite hasta que el sobrenadante ya no contenga cantidades significativas de material no encapsulado.

Cada lavado es un paso de 45 minutos e incluso después de 5 lavados se eliminan cantidades notables de material no encapsulado (véase la Figura 3). El símbolo Ξ en la Figura 3 indica la saturación de la lectura de fluorescencia.

b) Exclusión por tamaño

Columnas

La muestra se carga en una columna que separa las moléculas en función de su tamaño. Las estructuras macromoleculares, como los liposomas, pasan rápidamente por la columna, mientras que el avance de las moléculas más pequeñas se retrasa. Para la fluoresceína, por ejemplo, se utilizaron columnas Pd-10 desechables que tienen un corte molecular de 5.000 Da.

La optimización de estos métodos ha demostrado que si bien un paso por la columna elimina la mayoría del material no encapsulado, se recomienda un segundo paso para mejorar la precisión (véase la Figura 4).

Diálisis

Las muestras se cargaron en tubos de diálisis que contenían poros que correspondían a un peso molecular apropiado. Las partículas más grandes que este límite, como los liposomas, se retienen dentro del tubo, mientras que las partículas más pequeñas que los poros son capaces de difundirse libremente en una solución a granel más grande. La diálisis se realizó durante la noche e incluso después de dos pasos de diálisis hubo una fluorescencia de fondo considerable.

b) Encapsulación

Habiendo decidido el método más apropiado para la purificación, también se investigaron diferentes métodos para la encapsulación de compuestos de bajo peso molecular. Estos métodos incluyeron:

- (i) Hacer los liposomas en presencia del compuesto;
- (ii) Formación de vórtices;

- (iii) Sonicación;
- (iv) Congelación y descongelación; y
- (v) Electroporación.

5 Debido a la naturaleza altamente iónica de la fluoresceína, esta resultó ser incompatible con la electroporación que se basa en un entorno de baja salinidad.

La muestra sometida a vórtices produjo muy poca encapsulación, mientras que la sonicación, la congelación y descongelación y los liposomas preformados produjeron una encapsulación notable (véase la Figura 5).

2. Optimización de la composición en cuestión para diferentes cargas

10 La clasificación de la carga por peso molecular ha identificado 3 bandas: compuesto fluorescente de bajo peso molecular, por ejemplo, fluoresceína de sodio (PM: 376,28 Da), PM medio, por ejemplo α BT (8.000da) y Lucentis (48.000 Da), y PM alto, por ejemplo Avastin (149.000 Da.). Una ventaja de utilizar el sistema de columna de exclusión por tamaño es que es posible utilizar diferentes resinas con límites de peso molecular específicos.

15 Para la separación de α BT no encapsulada, los inventores optaron por probar una columna Superdex 75 que es capaz de separar proteínas en el intervalo de 3.000 a 70.000 Da. Inicialmente se utilizaron liposomas con fluoresceína encapsulada para enriquecer la columna e identificar la fracción en la que los liposomas salen de la columna. El pico de liposomas está indicado con el recuadro en la Figura 6 (parte superior). La columna se cargó entonces con una muestra de FITC- α BT. El recuadro en la Figura 6 (parte inferior) indica la fracción en la que la α BT sale de la columna.

Los resultados en la Figura 7 muestran que una columna Superdex 75 proporciona una resolución suficiente para la separación de α BT encapsulada y no encapsulada.

20 De especial interés será la capacidad de separar liposomas de proteínas de elevado peso molecular tales como anticuerpos, particularmente con respecto a agentes terapéuticos tales como Lucentis (48.000 Da) y Avastin (149.000 Da). Esto debe poder conseguirse utilizando una columna Superdex 200 que funciona en el intervalo de 10.000 a 600.000 Da.

25 Al adaptar el principio de columna de exclusión por tamaño de las columnas Pd10 alimentadas por gravedad a las columnas Superdex de FPLC, los inventores encontraron algunos problemas con la pérdida de muestra. Esto podría deberse a varios motivos, como la ruptura de los liposomas. Para poder investigarlo, los inventores adaptaron un ensayo para vigilar los niveles de fosfato para identificar los niveles de fosfolípidos.

Cuantificación de fosfolípidos

30 Las muestras se pueden procesar mediante 5 M de HCl y se pueden incubar con una mezcla de rodamina B y heptamolibato de amonio para proporcionar un valor de absorbancia correspondiente a la concentración de fosfato. La cantidad de fosfato en la solución refleja directamente los niveles de fosfolípido presentes.

Los inventores optimizaron el ensayo de fosfolípidos. La Figura 8 muestra la absorbancia a 555 nm y la concentración de fosfato correspondiente.

35 Este método se ha adaptado para detectar los grupos fosfato dentro de la "cabeza" de las moléculas fosfolípidas que se muestran a continuación. Esto nos permitirá identificar qué fracciones que salen de la columna de exclusión por tamaño contienen los liposomas encapsulados. Por lo tanto, se puede utilizar para detectar la eficiencia de encapsulación (véase la Figura 9).

Columnas de FPLC Superdex-75 y Superdex-200

40 Las muestras liposómicas se analizaron en las columnas de FPLC Superdex 75 y Superdex 200 y el producto de la elución se recogió en fracciones de 1,5 ml. Ninguna de las fracciones produjo el sedimento de liposomas esperado cuando se ultracentrifugó y el ensayo de fosfolípidos mostró cantidades insignificantes de fosfato en comparación con un control de amortiguador como se muestra en la Figura 10.

Los valores de absorbancia representados en la Figura 10 están por debajo del límite inferior de sensibilidad y confirman que la columna de FPLC es incompatible con la purificación liposómica.

45 Resina G50 gruesa

La limitación con las columnas PD-10 alimentadas por gravedad fue el corte de peso molecular (COPM) de 5.000 Da, lo que significó que no sería capaz de resolver la diferencia entre cualquier compuesto mayor de 5.000 Da. Otras resinas como la resina G-50 gruesa tienen un COPM mayor de 30.000 Da y por lo tanto deben ser capaces de separar pequeñas proteínas de los liposomas sin causar ruptura en los liposomas.

50 Se ideó un método más preciso y menos complicado para determinar la concentración de lípidos en función de la

turbidez de la solución, con lo cual se utilizó la capacidad de los liposomas para dispersar la luz a 600 nm para determinar su concentración.

Las muestras de liposomas, fluoresceína y α -BT se pasaron por la columna con G-50 gruesa individualmente y allí el perfil de elución se midió por turbidez a 600 nm y fluorescencia a 488 nm, respectivamente.

5 La capacidad de la columna para separar la fluoresceína, como se muestra en la Figura 11, indica que la columna está correctamente rellena y no tiene fugas, sin embargo, la resolución entre liposomas y α BT no proporciona una resolución suficiente. Este problema podría resolverse potencialmente utilizando una columna más larga. Debido al elevado precio de las columnas de cromatografía grandes y las cantidades posteriores de resina cara, se decidió revisar la ultracentrifugación como método de separación.

10 Ultracentrifugación

Los problemas encontrados al intentar utilizar la ultracentrifugación con fluoresceína dependieron predominantemente de la concentración. La gran cantidad de colorante presente limitó la eficacia del proceso, pero, dado que proteínas como α -BT y Lucentis deben usarse en concentraciones mucho más bajas, se deben requerir menos lavados.

15 Los protocolos de encapsulación iniciales se realizaron usando sonicación y la fluorescencia del sedimento se corrigió para que los volúmenes finales proporcionaran una cantidad de proteína encapsulada total.

Se descubrió que la ultracentrifugación era capaz de eliminar la proteína libre y que se estaba logrando un valor de alrededor del 10% de encapsulación con aproximadamente 1 μ g de los 10 μ g añadidos inicialmente que residían en el sedimento (véase la Figura 12).

20 Con base en los resultados de nuestra titulación de α -BT *in vivo*, 5 μ l de 50 μ g/ml fue la dosis óptima, representando una adición de 0,25 μ g. De estos resultados de encapsulación tenemos 1 μ g en 200 μ l y, por lo tanto, se requeriría una transmisión del 100% de la gota oftálmica de 50 μ l.

Eficacia de encapsulación

Con el fin de producir un objetivo de transmisión más realista, los inventores intentaron aumentar aún más la eficacia de encapsulación. Hay tres métodos posibles para hacerlo:

- 25
- Aumentar la concentración inicial de α -BT
 - Aumentar la concentración de lípidos
 - Aplicar métodos alternativos de encapsulación tales como congelación y descongelación y electroporación.

El aumento de la concentración de la α -BT solo mostró una ligera mejora en la encapsulación.

30 En la Figura 13, la diferencia que va de A y B a C y D a E y F es más pronunciada que las diferencias entre las dos barras de A y B, C y D o E y F, lo que indica que el aumento de la concentración de lípidos dio como resultado aumentos claros en el grado de encapsulación.

Dispersión de luz

35 Sin embargo, es difícil calcular un valor preciso para el grado de encapsulación, ya que el aumento de la dispersión de luz debido a la turbidez de la solución rica en liposomas interfiere con las lecturas de fluorescencia, reduciendo la señal fluorescente (véase la Figura 14).

Los resultados de la Figura 14 muestran que, incluso con valores más bajos de lípidos, la dispersión de la luz juega un efecto significativo de la fluorescencia, lo que sugiere que las eficacias de encapsulación podrían ser mayores que el 10% sugerido antes.

Alteración liposómica

40 Para determinar con precisión los valores de encapsulación, se incubó fluoresceína con amortiguador y liposomas solos y en presencia de una variedad de detergentes que incluían SDS, NP40, Tween-20 y Triton X-100.

45 En la Figura 15, se demostró que la presencia de detergente reduce la señal fluorescente general en muestras que contienen amortiguador y fluoresceína, un efecto que fue más pronunciado con intensidades fluorescentes más altas. La presencia de detergente, SDS en particular, redujo la pérdida de señal fluorescente debido a la dispersión de la luz en los lípidos. Usando SDS al 1% y limitando los rendimientos fluorescentes medidos por debajo de 200000AU, los inventores pudieron medir con precisión la eficiencia de encapsulación de la carga.

B. Ensayo *in vivo* del UDDS

1. Método novedoso para detectar la administración satisfactoria a la retina

Con el fin de evaluar la eficacia de diferentes composiciones en UDDS, los inventores identificaron un marcador novedoso, la bungarotoxina α (α BT) para evaluar la administración a la retina. La α BT (obtenida de Sigma (T9641)) marca específicamente las arterias en la retina, como se muestra en la Figura 16, y por lo tanto representa un marcador excelente.

2. Liberación de carga

Para evaluar a la liberación del material encapsulado, se administraron liposomas que contenían α BT y anexina V-776 encapsuladas mediante inyección intravítrea y se tomaron imágenes de los ojos después de 3 horas.

Los resultados de la Figura 17 muestran la liberación satisfactoria de α BT y anexina V-776. (A) demuestra la liberación de anexina en presencia de liposomas y (B) muestra la liberación de α BT encapsulada, mientras que (C) y (D) muestran el efecto de 1 mg/ml de anexina V-776 y 50 μ g/ml de α BT, respectivamente, inyectadas sin la presencia de liposomas. La intensidad de la señal de la α BT encapsulada se reduce en comparación con la α BT libre, pero se observa una liberación suficiente para provocar el marcado específico de las arterias.

3. Producción de anexinas

Los inventores obtuvieron una secuencia optimizada por codones para la anexina. Como muestra la Figura 18, el nuevo sistema expresa altos niveles de anexina V-GST y permite la generación de cantidades suficientes de anexina para la administración intravenosa.

4. Administración intravenosa - Implicaciones para la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera hematorretiniana (BHR)

A. Barrera hematorretiniana (BHR)

a) Administración intravenosa de fluoresceína sódica a la retina

El objetivo principal era mostrar la administración satisfactoria de material encapsulado a través de las barreras hematoencefálica y hematorretinoide. Una vez establecida la encapsulación y liberación optimizadas del UDDS, se evaluó la capacidad del UDDS para administrar fluoresceína sódica a la retina y el cerebro.

Se administraron 300 μ l de fluoresceína sódica al 5% o 1 ml de fluoresceína sódica encapsulada al 0,2% a la rata a través de vena de la cola y se observó la retina. La fluoresceína libre se eliminó mediante el uso de columnas de ultracentrifugación y PD-10 como se describió anteriormente.

La fluoresceína es incapaz de atravesar una barrera hematorretiniana y permanece aislada a los vasos, como se muestra arriba en la Figura 19 (D, E y F). Es importante destacar que los vasos sanguíneos retinianos no se vieron con el material encapsulado (A-C), ya que no tienen (D-F), aunque hay un indicio de fluorescencia de la pared arterial en el ojo tratado encapsulado a los 34 minutos (B). Sin embargo, los ojos tratados con material encapsulado mostraron después de 7 minutos parches focales o manchas de fluorescencia en la retina, como destacan los círculos en la Figura A. La frecuencia de estos parches fluorescentes pareció alcanzar su punto máximo después de 30 minutos, mostrado en la Figura B, antes de comenzar a dispersarse después de 74 minutos, como se muestra en la Figura C. Estos no existían en los ojos tratados con material no encapsulado. Se cree que estos parches focales de fluorescencia son liposomas intactos que contienen fluoresceína. La localización de estos parches de fluorescencia sugiere la administración de liposomas intactos a la retina. También confirma que solo la fluoresceína encapsulada cruzó la BHR. La aparición de parches fluorescentes o "fugas monofocales" de fluoresceína sódica es similar a la que se ha descrito cuando se produce una alteración de la BHE en el cerebro (véase la Figura 20 de Natah, S. S. et al. J Appl Physiol 107: 1348-1356 2009).

b) Desarrollo de un modelo de FCVE para evaluar la liberación terapéutica

Con el fin de evaluar la liberación terapéutica de la carga de los liposomas encapsulados en los ojos, se desarrolló un modelo de FCVE usando 500 ng por ojo de FCVE humano recombinante (rhVEGF165). La Figura 21 muestra un ojo con mayor tortuosidad de vasos sanguíneos (A, imagen reflectante), permeabilidad y engrosamiento de los vasos sanguíneos, visto después de una angiografía con fluoresceína tomada 24 horas después de las inyecciones de FCVE (B, imagen fluorescente). La reversión de estos efectos se logró utilizando inyecciones intravítreas de 2,5 μ l de Lucentis de calidad terapéutica (C-D). El ojo tratado con Lucentis muestra un tamaño de vaso reducido a normal (C, imágenes reflectantes), sin permeabilidad y anatomía vascular normal (D, imagen fluorescente) en relación con el modelo de FCVE sin tratar.

c) Administración intravenosa de Lucentis a la retina

Debido al gran peso molecular de Lucentis, no puede atravesar la barrera hematorretiniana, por lo que no es adecuado para la administración intravenosa. Este estudio se diseñó para ver si Lucentis encapsulado (UDDS de Lucentis) podría administrarse satisfactoriamente por vía intravenosa a la retina, a través de la BHR. Se prepararon animales con un ojo tratado con FCVE y dejando el ojo contralateral sin tratar. En el momento del tratamiento con FCVE, las ratas también recibieron una inyección intravenosa de 1 ml de Lucentis encapsulado (A, B) o 300 μ l e Lucentis de calidad

clínica (C, D). Se administró un volumen mayor del material encapsulado para permitir la concentración reducida de Lucentis debido a la eficacia de encapsulación.

5 La Figura 22 muestra angiogramas de fluoresceína tomados a las 24 (A, C) y 48 (B, D) horas de los ojos izquierdos tratados con FCVE intravítreo. En primer lugar, es obvio que el tratamiento simultáneo de Lucentis con FCVE indujo a las 24 horas grandes cambios inflamatorios incluyendo permeabilidades, tortuosidad y engrosamiento de vasos (A, C) extensos. Sin embargo, a las 48 horas hay una gran diferencia con el animal tratado con Lucentis encapsulado (B) que no muestra áreas de permeabilidad focal, sino una vasculitis (flebitis), en comparación con fugas masivas, neovascularización y hemorragia en el animal tratado con Lucentis de calidad clínica intravenoso. Esto indica claramente que el Lucentis encapsulado ha sido liberado a las 48 horas con un efecto terapéutico de revertir cambios gravísimos. Esto implicaría una liberación sostenida /retardada de Lucentis durante el período, atravesando la BHR satisfactoriamente.

15 También se evaluó el efecto de administrar Lucentis encapsulado por vía intravenosa 24 horas después del FCVE intravítreo (véase la Figura 23). Después de una angiografía con fluoresceína tomada 28 horas después de las inyecciones de FCVE (B, imagen fluorescente), se logró la reversión de los efectos del FCVE. El ojo tratado con Lucentis encapsulado muestra tortuosidad reducida, tamaño de vaso reducido a normal (A, imágenes reflectantes), sin fugas y anatomía vascular más normal (B, imagen fluorescente).

Todo esto sugiere que Lucentis encapsulado ha atravesado la BHR y ha sido terapéutico.

B. Barrera hematoencefálica

Administración intravenosa de fluoresceína al cerebro

20 Se administraron 300 µl de fluoresceína sódica al 5% o 1 ml de fluoresceína sódica encapsulada al 0,2% a la rata a través de la vena de la cola y se observó la retina. La fluoresceína libre se eliminó mediante el uso de columnas de ultracentrifugación y PD-10 como se describió anteriormente. Después de 2 horas, con anestesia general, los animales se sometieron a perfusión de fijación con paraformaldehído al 4%. Los cerebros se almacenaron en paraformaldehído al 4% durante la noche, tras lo cual se cortaron rebanadas de 800 µm y se examinaron bajo microscopía confocal fluorescente.

La fluoresceína sódica es incapaz de atravesar una barrera hematoencefálica intacta; esta es la base de varios experimentos, incluido el estudio mencionado anteriormente por Natah, S. S. et al. J Appl Physiol 107: 1348-1356 2009.

30 Las imágenes de la Figura 24 provienen de regiones similares del cerebro de un animal con fluoresceína sódica encapsulada intravenosa (A-B) en comparación con una fluoresceína sódica intravenosa simple (C-D). Se muestran las imágenes tanto de fluorescencia (A, C) como de transmisión (B, D). Obviamente, solo el material encapsulado muestra fluorescencia (A) sin ninguna señal en absoluto en el cerebro tratado con fluoresceína sódica intravenosa simple (C). Esto confirma el hecho de que la encapsulación permite que la fluoresceína sódica atraviese la BHE.

35 Además, solo el material encapsulado tenía parches de fluorescencia evidentes en la sustancia del cerebro como se muestra en imágenes fluorescentes representativas (E, G) con imágenes de transmisión correspondientes (F, H, respectivamente). La aparición de parches fluorescentes o "fugas monofocales" de fluoresceína sódica es similar a la que se ha descrito cuando se produce una alteración de la BHE en el cerebro, como se explicó antes (Natah, S. S. et al. J Appl Physiol 107: 1348-1356 2009).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un derivado de vitamina E, una proteína de unión a fosfolípidos aniónicos, un fosfolípido aniónico y un esteroles, donde el derivado de vitamina E, el fosfolípido aniónico y el esteroles forman un liposoma, y donde el derivado de vitamina E es tocoferol y la proteína de unión a fosfolípidos aniónicos es anexina V.
2. Composición según la reivindicación 1, que comprende además la carga que transportar.
3. Composición según la reivindicación 1, donde el tocoferol es D- α -tocoferilsuccinato esterificado con polietilenglicol 1000 (TPGS).
- 10 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fosfolípido aniónico es fosfatidilserina.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el esteroles es colesterol o 6-cetocolesterol.
6. Composición según la reivindicación 2, donde la carga es un agente terapéuticamente activo.
- 15 7. Composición según la reivindicación 6, donde la carga es un neuroprotector, un factor de crecimiento, un antagonista del factor de crecimiento, un anticuerpo, un aptámero o un esteroles.
8. Composición según la reivindicación 7, donde el anticuerpo es ranibizumab (Lucentis) o bevacizumab (Avastin)
9. Método para preparar una composición para administrar una carga a un sujeto que comprende
 - a) formar liposomas a partir de tocoferol, anexina V, un fosfolípido aniónico, tal como fosfatidilserina, y un esteroles; y
 - b) encapsular la carga en la composición liposómica.
- 20 10. Método según la reivindicación 9, donde la carga se encapsula estando presente en el momento de la formación del liposoma, o mediante electroporación, congelación y descongelación, sonicación o vórtice.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso, caracterizada porque es para uso como tratamiento.
- 25 12. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como vehículo para suministrar un agente a través de la barrera hematoencefálica o a través de la barrera hematorretiniana.

Figura 1

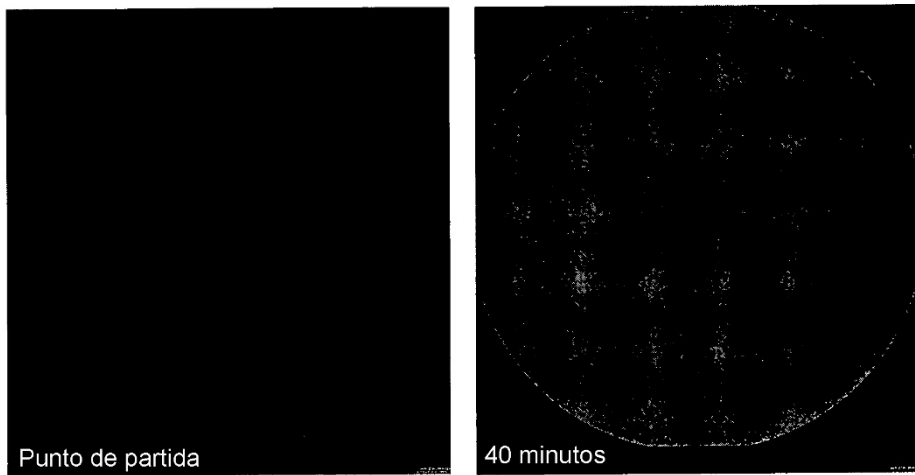
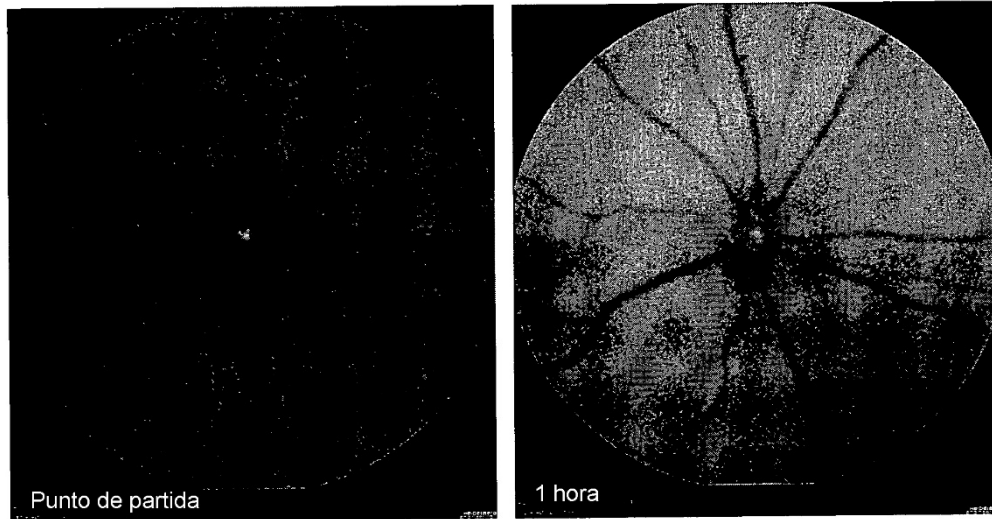


Figura 2



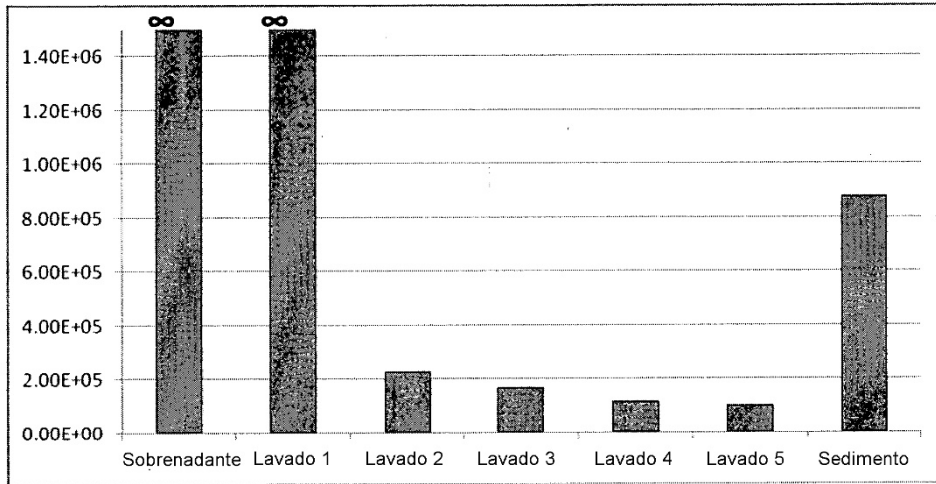


Figura 3

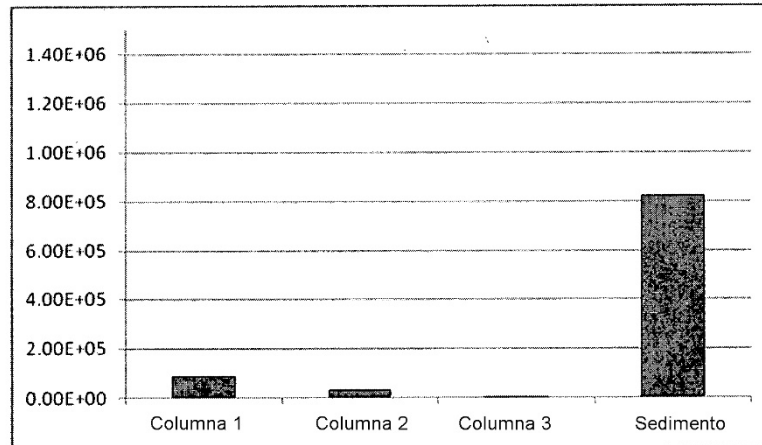


Figura 4

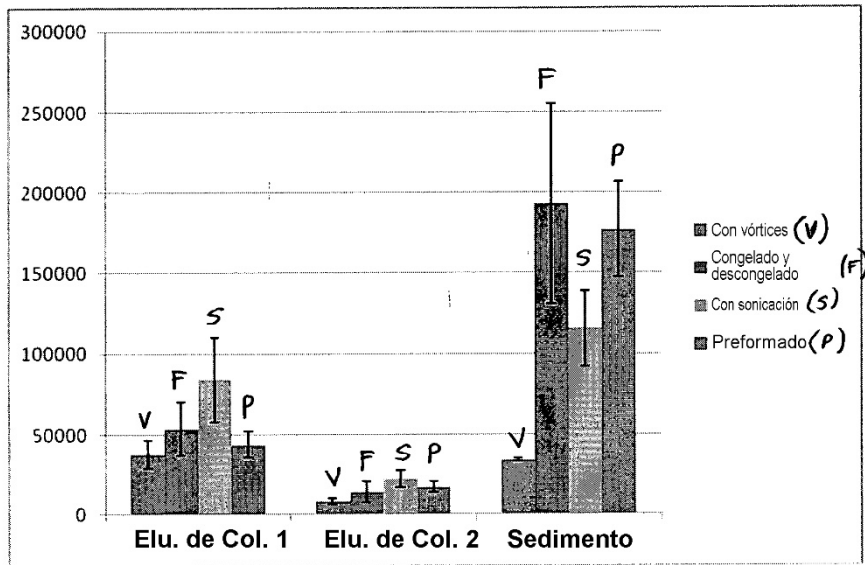


Figura 5

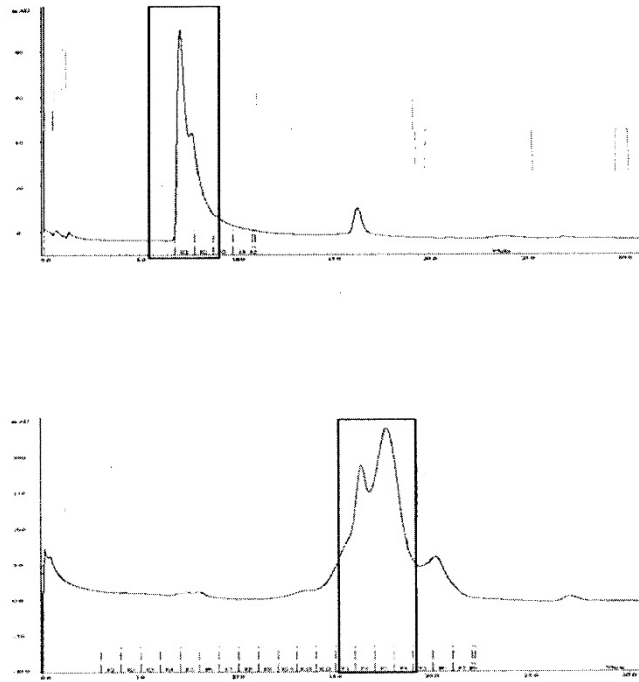


Figura 6

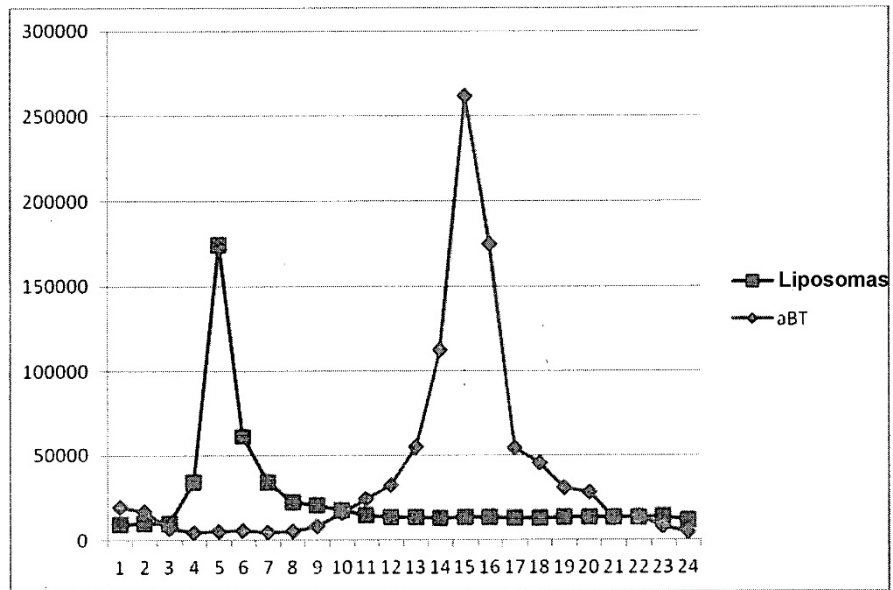


Figura 7

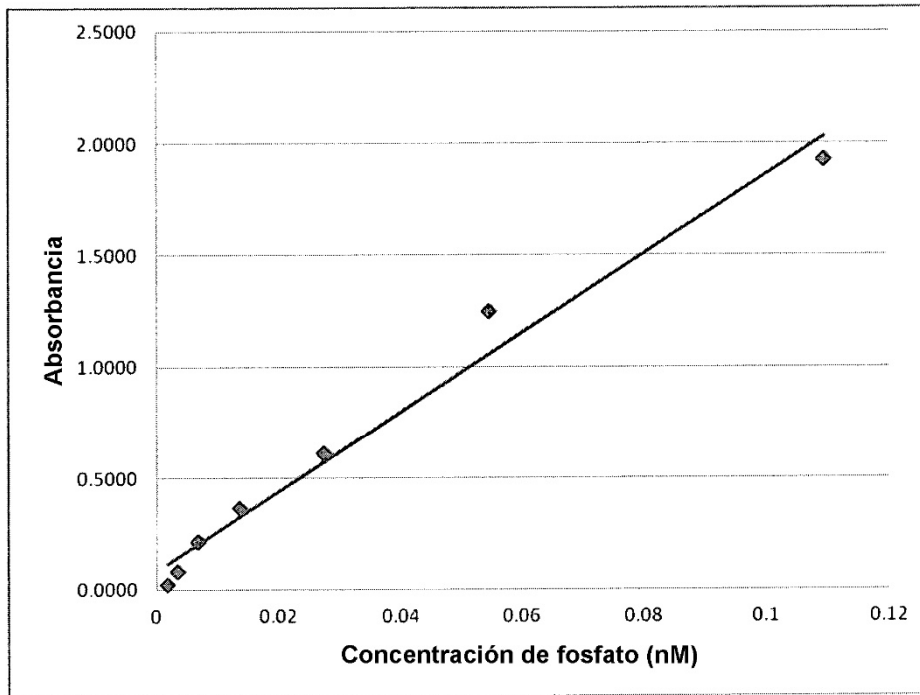


Figura 8

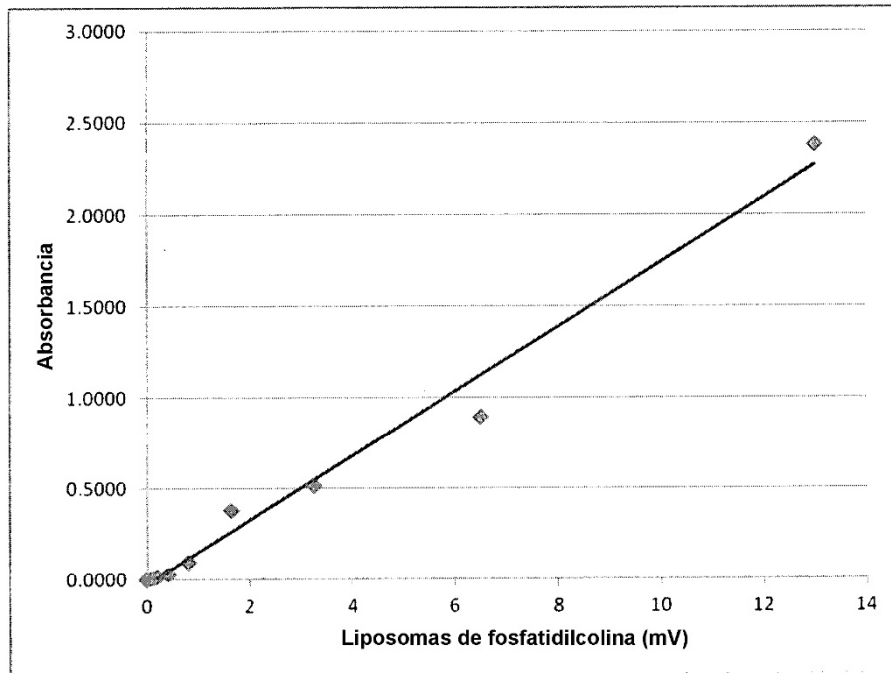


Figura 9

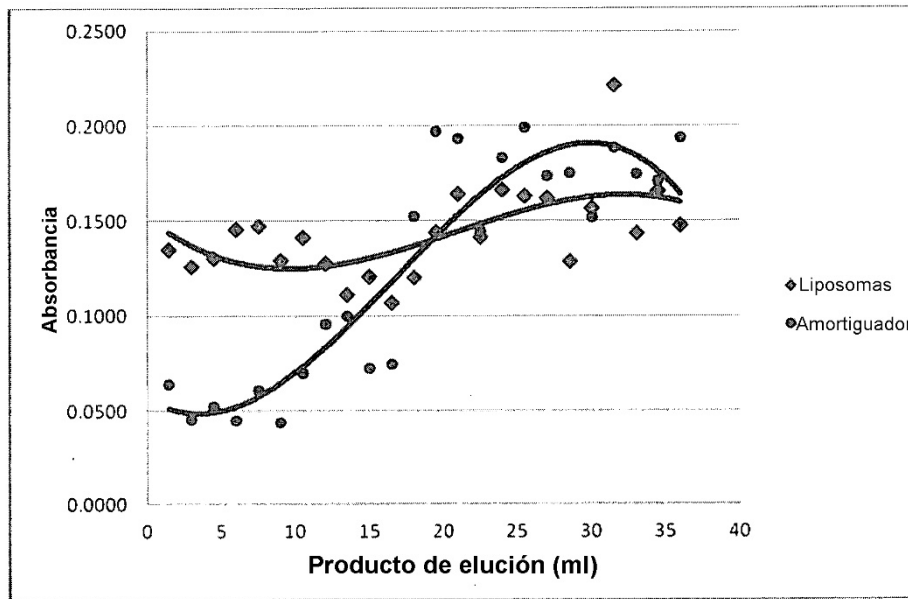


Figura 10

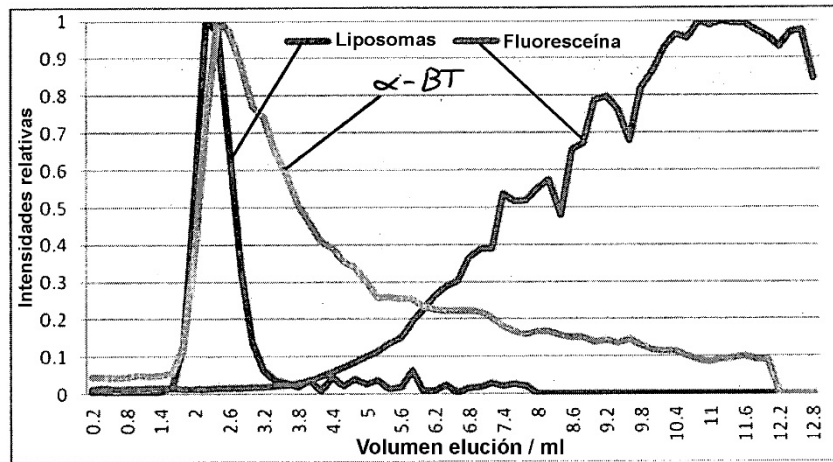


Figura 11

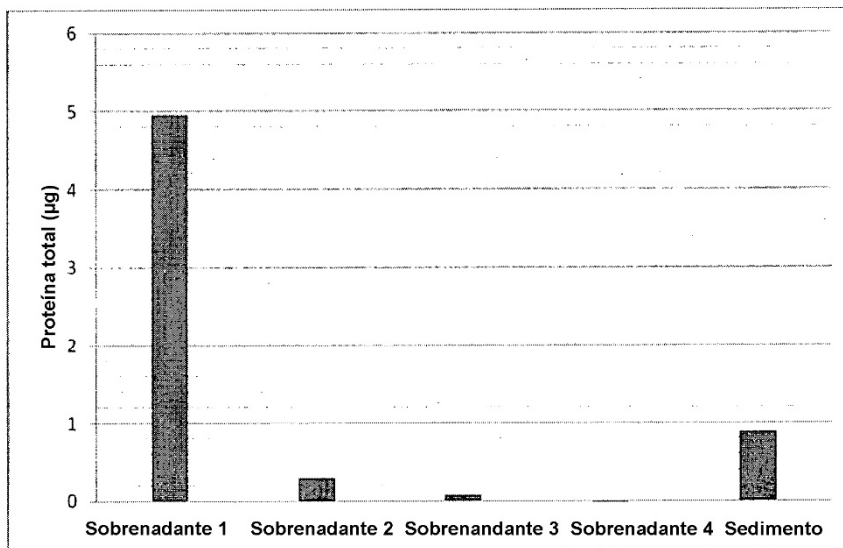


Figura 12

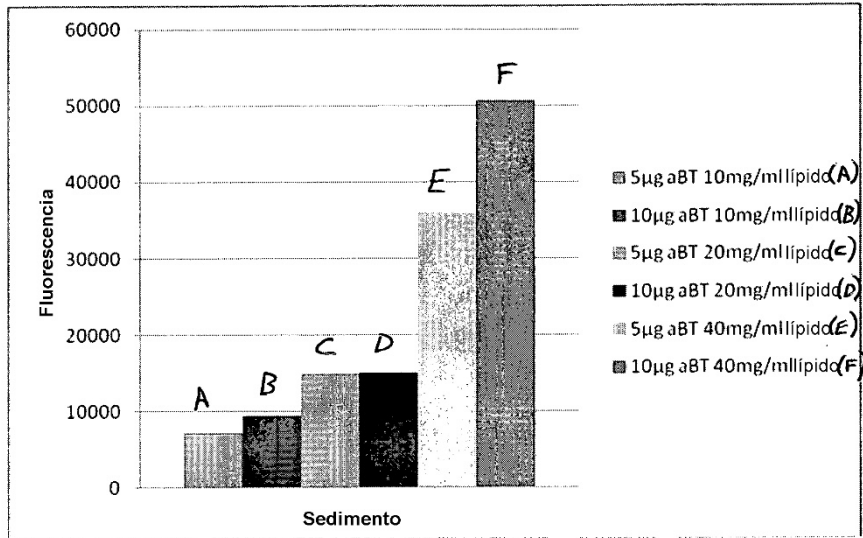


Figura 13

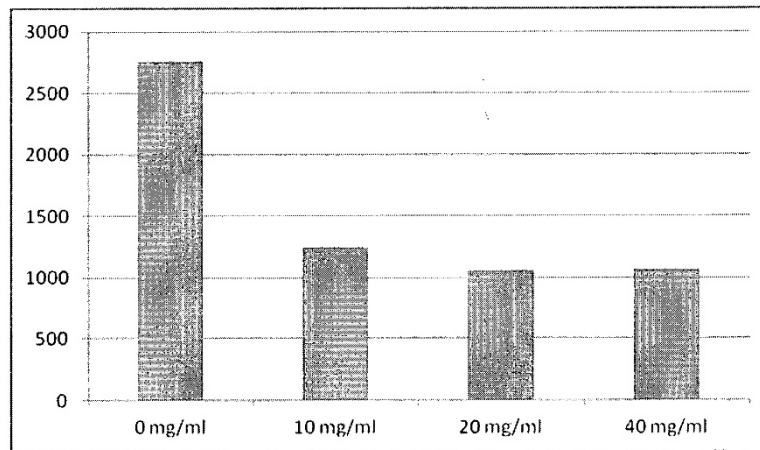


Figura 14

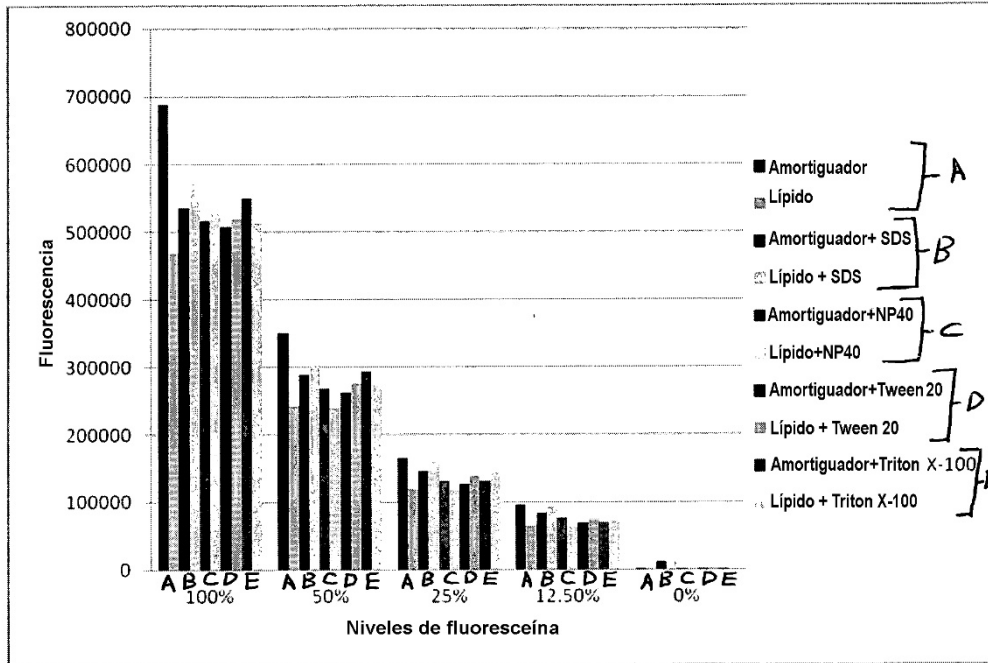


Figura 15

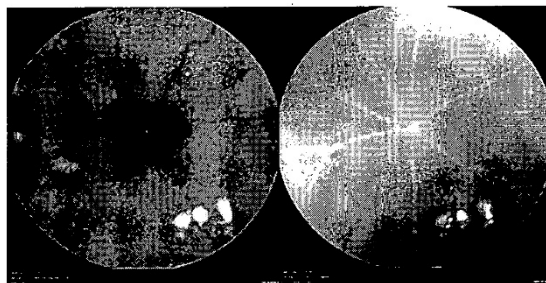


Figura 16

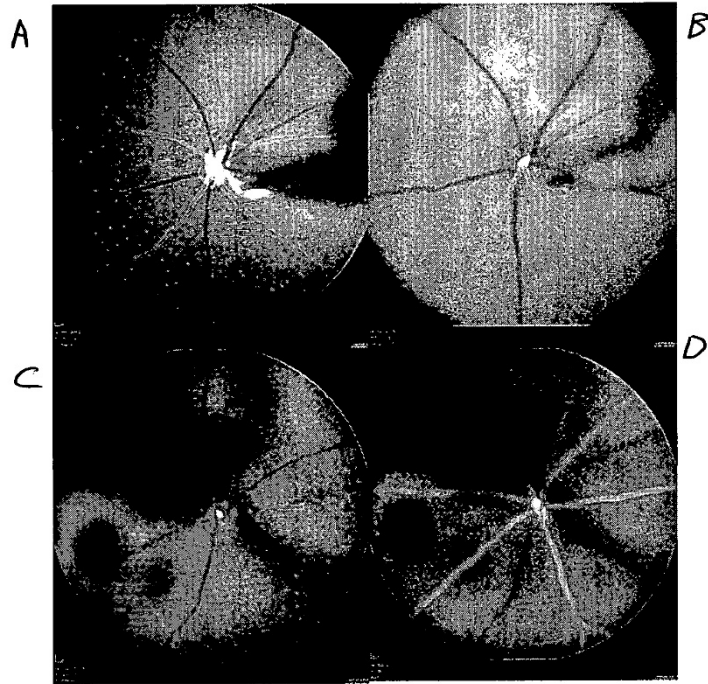


Figura 17

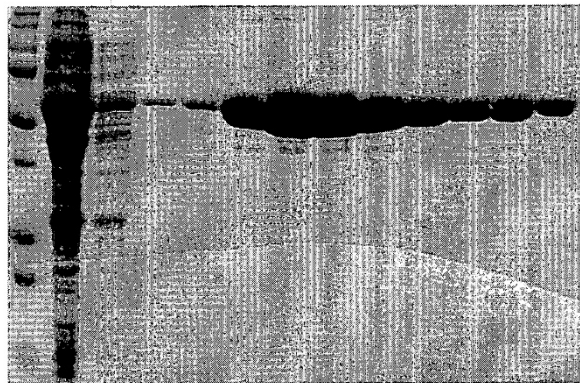


Figura 18

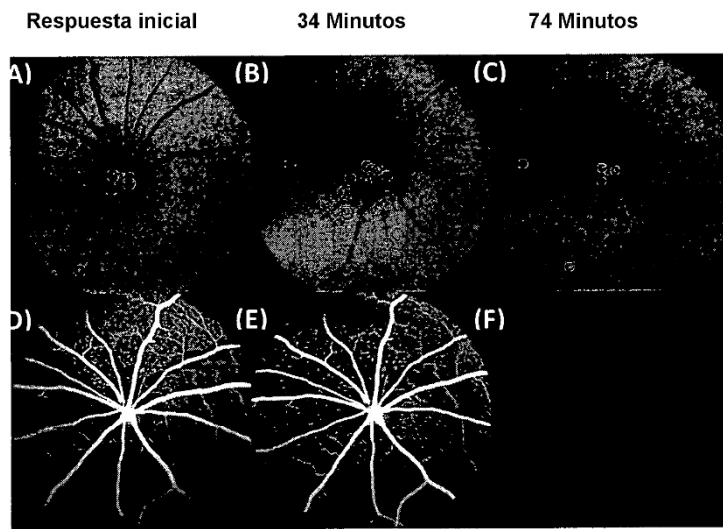


Figura 19

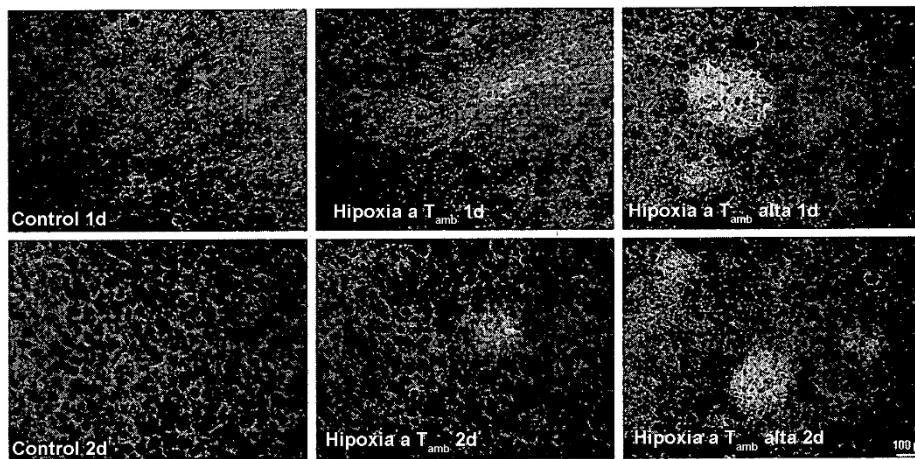


Figura 20

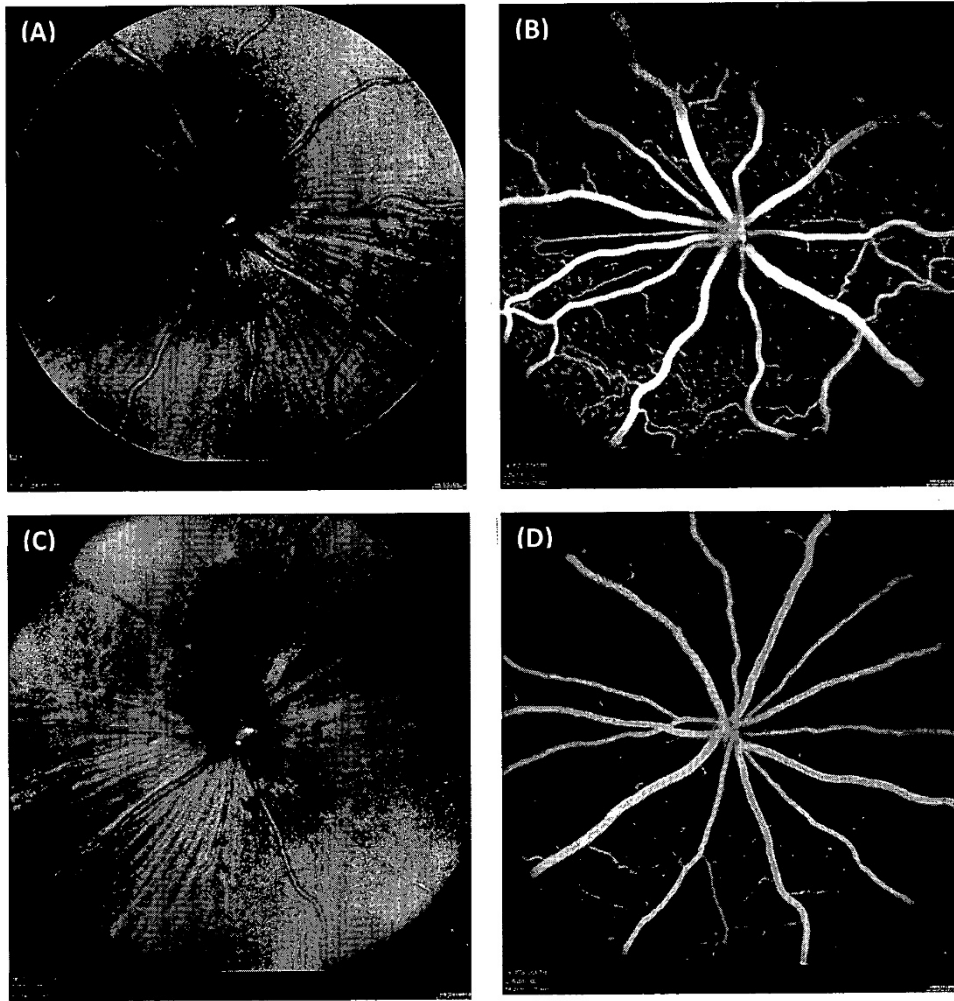


Figura 21

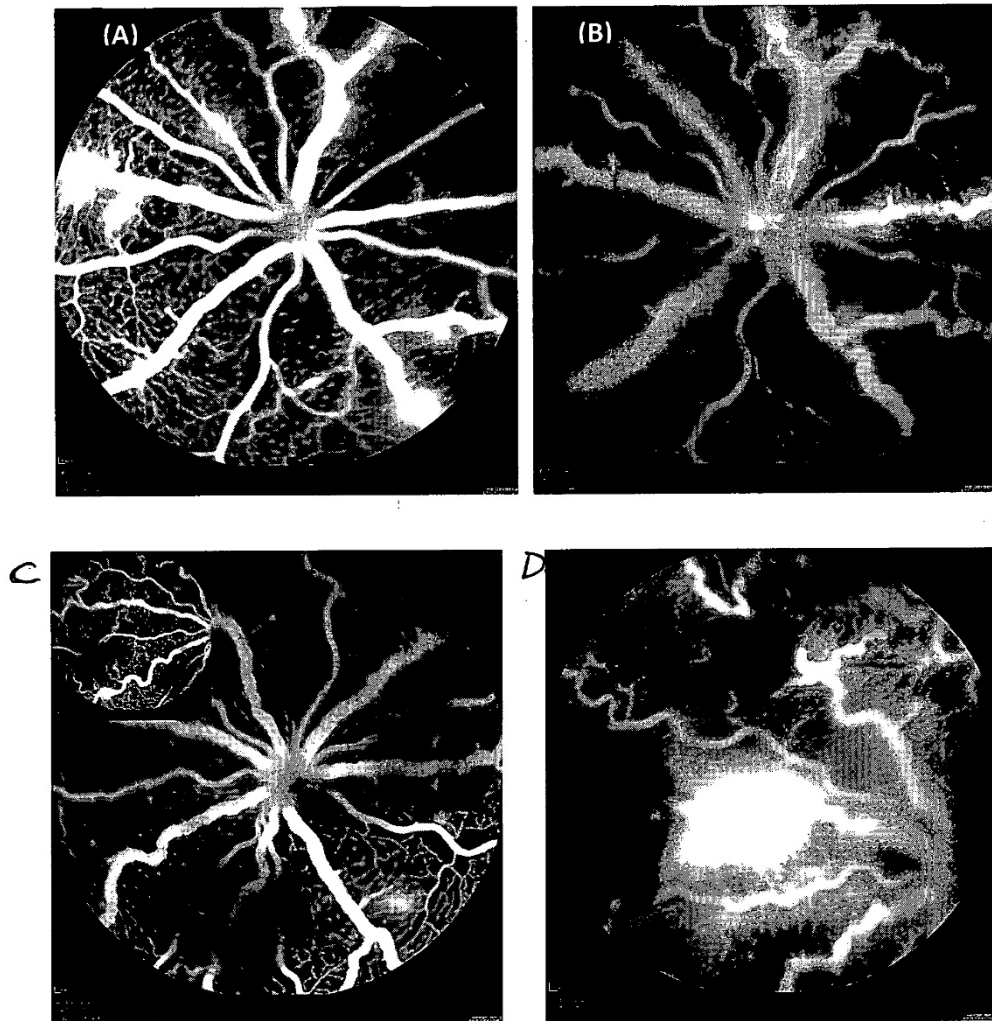


Figura 22

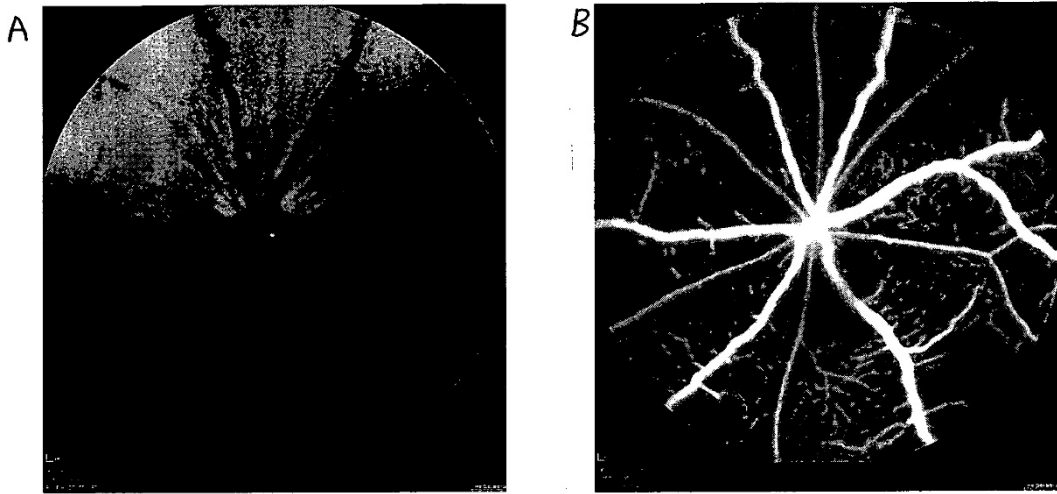


Figura 23

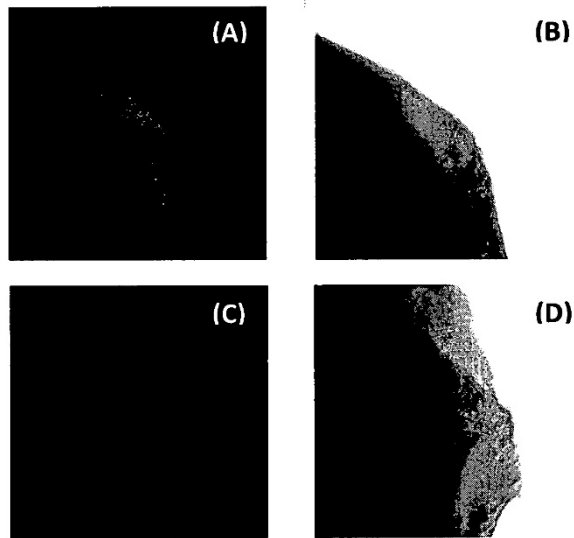


Figura 24

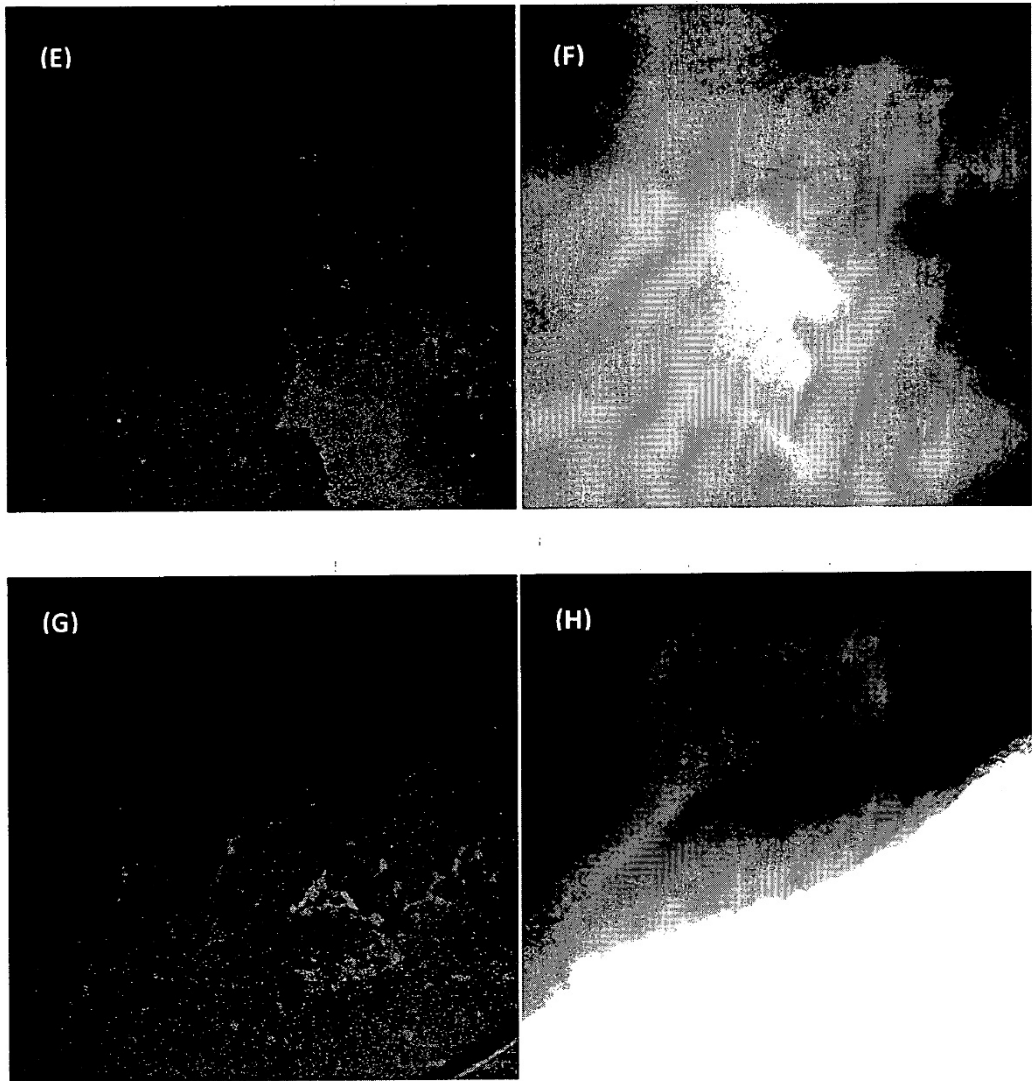


Figura 24 (Cont.)