



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 284 201**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/127 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98910354 .4**

(86) Fecha de presentación : **12.03.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1014945**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2000**

(54) Título: **Composiciones de lípidos catiónicos direccionadas a las células angiogénicas endoteliales.**

(30) Prioridad: **12.03.1997 US 820337**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

(73) Titular/es:
The Regents of the University of California
1111 Franklin Street, 12Th Floor
Oakland, California 94607-5200, US

(72) Inventor/es: **McDonald, Donald, M.;**
McLean, John;
Thurston, O., Gavin y
Baluk, Peter

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Composiciones de lípidos catiónicos direccionadas a las células angiogénicas endoteliales.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención puede aplicarse al tratamiento de una diversidad de enfermedades y anormalidades diferentes. En general, el cáncer se trata actualmente de modo directo por medios físicos tales como extirpación quirúrgica del tejido canceroso. Adicionalmente, puede tratarse el mismo por medios químicos tales como la quimioterapia. Es-
 10 tos tratamientos, y otros tratamientos afines están dirigidos, en general, a tratar directamente el tejido canceroso. Con objeto de proporcionar una comprensión del modo en que la presente invención se desvía de las modalidades de tratamiento convencionales, se proporciona una descripción breve y general de las tecnologías de tratamiento actuales en estas áreas.

15 Tratamientos del cáncer

El término “cáncer” abarca un espectro de enfermedades que varían en tratamiento, pronóstico, y curabilidad. El enfoque para el diagnóstico y tratamiento depende del sitio de origen del tumor, el grado de propagación, los sitios de implicación, el estado fisiológico del paciente, así como del pronóstico. Una vez diagnosticado, el tumor se “es-
 20 calona” usualmente, un proceso que implica utilizar las técnicas de cirugía, examen físico, histopatología, formación de imagen, y evaluación en laboratorio para definir el alcance de la enfermedad y dividir la población de pacientes de cáncer en grupos por orden de probabilidad de curación decreciente. Tales sistemas se utilizan tanto para planificar el tratamiento como para determinar los pronósticos para el paciente (Stockdale, F., 1996, “Principles of Cancer Patient Management”, en Scientific American Medicine, vol. 3, Dale, D.C., and Federman, D.D. (compiladores), Scientific
 25 American Press, Nueva York). El tipo o el escalón del cáncer pueden determinar cuál de los tres tipos de tratamiento generales se utilizará: cirugía, terapia de radiación, y quimioterapia. Puede elegirse también un plan de tratamiento agresivo de modalidad combinada. A este fin, puede utilizarse cirugía para extirpar el tumor primario, y las células restantes se tratan con terapia de radiación o quimioterapia (Rosenberg, S.A., 1985, “Combined-modality therapy of cancer: what is and when does it work?” *New Engl. J. Med.* 312: 1512-14).

La cirugía desempeña el papel central en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. En general, se requiere un planteamiento quirúrgico para la biopsia, y la cirugía puede ser el tratamiento definitivo para la mayor parte de los pacientes con cáncer. La cirugía se utiliza también para reducir la masa del tumor, para reseca las metástasis, para resolver las urgencias médicas, para paliar y para rehabilitar. Aunque la técnica quirúrgica primaria para el tratamiento del cáncer
 35 ha implicado el desarrollo de un campo operativo en el que se practica la resección de los tumores bajo visualización directa, las técnicas actuales permiten la realización de algunas resecciones por medios endoscópicos. Un problema fundamental en el tratamiento del cáncer es la consideración del riesgo operativo (Stockdale, F. *supra*).

La terapia de radiación juega un papel importante en el tratamiento del cáncer tanto primario como paliativo. Tanto
 40 la teleterapia (terapia de radiación con megavoltaje) como la braquiterapia (radiación intersticial e intracavitaria) son de uso común. La radiación electromagnética en forma de rayos X se utiliza muy comúnmente en teleterapia para tratar tumores malignos comunes, aun cuando se utilizan también los rayos gamma, una forma de radiación electromagnética similar a los rayos X pero emitida por isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos. La terapia de radiación transfiere energía a los tejidos como paquetes de energía discretos, llamados fotones, que deterioran tanto los tejidos
 45 malignos como los normales por producir ionización dentro de las células. La diana para los iones es muy comúnmente el DNA; la terapia de radiación aprovecha el hecho de que el deterioro por la radiación no es uniforme entre los tejidos malignos y no malignos - las células que se dividen rápidamente son más sensibles al deterioro del DNA que las células en reposo (Pass H.I., 1993, “Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use”, *J. Natl. Cancer Instit.* 85: 443-56). La terapia de radiación está asociada con ventajas específicas así como con toxicidades importantes. La
 50 radiación se prefiere en ciertas áreas anatómicas (v.g., el mediastino), donde la radiación puede ser el único método local de tratamiento factible, y la radiación puede ser también la única modalidad local factible si la implicación del tumor es extensa. La radiación puede utilizarse también cuando el paciente encuentra inaceptable la cirugía, o cuando el estado médico del paciente hace prohibitivo un procedimiento quirúrgico. El tratamiento por radiación implica deterioro de los tejidos, que puede conducir a efectos de radiación precoces y tardíos. Los efectos precoces (toxicidad aguda de la terapia de radiación) incluyen eritema de la piel, descamación, esofagitis, náusea, alopecia,
 55 y mielosupresión, mientras que los efectos tardíos incluyen necrosis y fibrosis tisular, y determinan usualmente la toxicidad límite de la terapia de radiación (Stockdale, F. *supra*).

Prácticamente la totalidad de los agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente interfieren con la síntesis del
 60 DNA, con la provisión de precursores para la síntesis de DNA y RNA, o con la mitosis, y por consiguiente están direccionados a las células proliferantes (Stockdale, F. “Cancer growth and chemotherapy”, *supra*). La investigación de tumores animales y las pruebas clínicas humanas han demostrado que las combinaciones de fármacos producen tasas más elevadas de respuesta objetiva y una supervivencia más larga que los agentes individuales (Frei, E. III, 1972, “Combination cancer therapy: presidential address”, *Cancer Res.* 32: 2593-2607). La terapia de combinación de
 65 fármacos utiliza los diferentes mecanismos de acción y potenciales citotóxicos de fármacos múltiples, con inclusión de agentes alquilantes, antimetabolitos, y antibióticos (Devita, V.T., *et al.*, 1975, “Combination versus single agent chemotherapy; a review of the basis for selection of drug treatment of cancer”, *Cancer* 35:98-110). La condición fisiológica del paciente, las características del crecimiento del tumor, la heterogeneidad de la población de células

tumorales, y el estatus de resistencia a fármacos múltiples del tumor influyen en la eficacia de la quimioterapia. Generalmente, la quimioterapia no está direccionada (aunque estas técnicas se encuentran en desarrollo, v.g. Pastan, I. *et al.*, 1986, "Immunotoxins", *Cell* 47: 641-648), y pueden producirse como resultado efectos secundarios tales como depresión de la médula ósea, gastroenteritis, náusea, alopecia, deterioro del hígado o el pulmón, o esterilidad.

Tratamientos actuales - Inmunología

Los regímenes del tratamiento arriba descritos han alcanzado grados de éxito variables. Dado que la tasa de éxito está muy lejos de ser perfecta, en muchos casos continúa la investigación para desarrollar tratamientos mejores. Un área prometedora de la investigación se refiere a la afección del sistema inmunitario. Por el uso de ingeniería genética y/o estimulación química es posible modificar y/o estimular respuestas inmunitarias a fin de que el propio sistema inmune del cuerpo trate la enfermedad v.g., anticuerpos que destruyan las células cancerosas. Este tipo de tratamiento se desvía de los arriba descritos en el sentido que utiliza un proceso biológico para combatir una enfermedad. Sin embargo, el tratamiento es todavía un tratamiento directo, lo que significa que los anticuerpos creados atacan directamente las células del cáncer.

La presente invención puede utilizarse para tratamientos que implican una desviación radical de los tratamientos normales en el sentido de que la presente invención no implica afectar directamente a las células cancerosas, lesionadas o inflamadas.

Otros han reconocido que, al menos en teoría, es posible tratar el cáncer o la inflamación asociada con la angiogénesis por inhibición de la angiogénesis. Un ejemplo típico del pensamiento actual en relación con esta materia se expone en la Publicación PCT WO 95/25543, publicada el 18 de septiembre de 1995. Esta solicitud de patente publicada describe la inhibición de la angiogénesis por administración de un anticuerpo que se fija a un antígeno que se cree está presente en la superficie de las células angiogénicas endoteliales. Específicamente, la solicitud describe administrar un anticuerpo que se fija a $\alpha_v\beta_3$, que es un receptor de membrana que se cree media las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular a las que se hace referencia generalmente como sucesos de adhesión celular. Por el bloqueo de este receptor, el tratamiento confía en inhibir la angiogénesis y tratar con ello el cáncer y la inflamación.

Sumario de la invención

Se describe un liposoma catiónico, que comprende al menos 5% molar de al menos un lípido catiónico y opcionalmente lípidos neutros y un compuesto tóxico que destruye una célula angiogénica endotelial de un tumor, caracterizado por tener un potencial zeta mayor que 0 mV cuando está presente al pH fisiológico y el uso del liposoma de la invención para suministrar selectivamente el compuesto tóxico a las células angiogénicas endoteliales de un tumor. El uso implica inyectar, preferiblemente en el sistema circulatorio y más preferiblemente por vía intraarterial, liposomas catiónicos que comprenden lípidos catiónicos y un compuesto tóxico que destruye una célula angiogénica endotelial de un tumor. Después de la administración, los liposomas catiónicos se asocian selectivamente con células angiogénicas endoteliales, lo que significa que los mismos se asocian con las células angiogénicas endoteliales en una proporción cinco veces mayor o más (preferiblemente diez veces mayor o más) que aquella con la que se asocian a las células endoteliales correspondientes en reposo, que no experimentan angiogénesis. Cuando los liposomas se asocian con las células angiogénicas endoteliales, los mismos son absorbidos por la célula endotelial y producen su efecto deseado. La sustancia puede destruir la célula endotelial. La invención incluye una composición que afecta selectivamente a las células angiogénicas endoteliales, que comprenden lípidos catiónicos y una sustancia tóxica en donde la composición tiene, en la sangre, mayor afinidad para las células angiogénicas endoteliales en comparación con las células endoteliales normales correspondientes, en donde la composición se asocia selectivamente con las células angiogénicas endoteliales de un vaso sanguíneo angiogénico durante cierto tiempo y de una manera tal que la composición entra en las células angiogénicas endoteliales. Esta composición está formulada preferiblemente para administración por inyección en el sistema circulatorio de un mamífero. La composición tiene preferiblemente en la sangre una afinidad cinco veces mayor o más, y más preferiblemente diez veces mayor o más para las células angiogénicas endoteliales en comparación con las células endoteliales normales correspondientes. La composición comprende preferiblemente 5% molar o más de lípidos catiónicos.

Otro objeto adicional de la invención consiste en utilizar un liposoma catiónico para destruir un tumor indeseable por suministro de un compuesto tóxico a las células angiogénicas endoteliales del tumor, compuesto que destruye las células angiogénicas endoteliales y, después de ello, destruye las células tumorales.

Una característica de la invención es que los liposomas catiónicos de la invención se asocian selectivamente con las células angiogénicas endoteliales con una preferencia mucho mayor (cinco veces mayor o más, y preferiblemente diez veces mayor o más) que aquella con la que se asocian los mismos con las células endoteliales correspondientes no implicadas en angiogénesis.

Una ventaja de la invención es que los liposomas catiónicos de la invención pueden utilizarse para suministrar con precisión pequeñas cantidades de compuestos tóxicos a las células endoteliales, células que se ven afectadas de una manera (v.g., desactivadas) tal que el vaso sanguíneo se destruye o se hace inoperante por ejemplo por un coágulo de sangre y el suministro de nutrientes a los tejidos circundantes (tales como las células tumorales) se suprime, destruyendo con ello el tejido (v.g., destruyendo un tumor sólido).

Otra ventaja de la invención es que los liposomas catiónicos de la invención pueden utilizarse para inhibir la angiogénesis asociada con tumores malignos o benignos asociados a su vez con la angiogénesis en curso.

Una característica importante de la invención es que varias clases de enfermedades y/o anomalías se tratan sin tratar directamente el tejido implicado en la anomalía, v.g. por inhibición de la angiogénesis se suprime el suministro de sangre a un tumor y el tumor se destruye sin tratar directamente las células tumorales de ningún modo.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica después de la lectura de la descripción proporcionada en esta memoria, en conexión con las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1-10 se presentan en este caso en una versión en color y una versión en blanco y negro. Esto ha sido hecho debido a que la invención se comprende mejor mediante fotografías en color, fotografías que pueden no ser aceptables en la práctica actual de las solicitudes PCT. Las fotografías en color para las Figuras 1-10 se encuentran en la solicitud de patente U.S. número de serie 08/820.337, presentada el 12 de marzo de 1997. Adicionalmente, fotografías en color que muestran claramente la mayor afinidad de los complejos marcados de la invención para las células angiogénicas endoteliales en comparación con las células endoteliales normales correspondientes se muestran en Thurston, *et al.*, "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cell in Tumors and Inflammation in Mice", *J. Clin. Invest.*, 1 de abril de 1998.

La Figura 1 es una micrografía de fluorescencia que muestra la absorción de los complejos fluorescentes rojos DDAB:colesterol-DNA marcados con CM-DiI en vasos sanguíneos angiogénicos de un folículo en un ovario de ratón normal (barra de escala: 60 μm);

la Figura 2 es una micrografía de fluorescencia que muestra la absorción de los complejos fluorescentes rojos DDAB:colesterol-DNA marcados con CM-DiI en vasos sanguíneos angiogénicos en una sección de un tumor pancreático en un ratón RIP1-Tag5 - los vasos están teñidos de verde con una lectina fluorescente (barra de escala: 40 μm);

la Figura 3 es una micrografía de fluorescencia con bajo aumento que muestra la escasa o nula absorción de los complejos DOTAP:colesterol-DNA marcados con Rojo Texas (amarillo-anaranjado) en los vasos sanguíneos de un islote pancreático de ratón normal (barra de escala: 150 μm);

la Figura 4 es una micrografía de fluorescencia con bajo aumento que muestra la absorción de los complejos DOTAP:colesterol-DNA marcados con Rojo Texas (amarillo-anaranjado) en los vasos sanguíneos de un tumor pancreático en un ratón RIP1-Tag2 (barra de escala: 150 μm);

la Figura 5 es una micrografía confocal que muestra la escasa o nula absorción de los liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en un islote pancreático normal; los vasos se tiñeron (verde) con lectina fluorescente (barra de escala: 50 μm);

la Figura 6 muestra una micrografía confocal de la absorción de liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en un tumor pancreático en un ratón RIP1-Tag2. Los vasos se tiñeron por perfusión de lectina fluorescente de *Lycopersicum esculentum* (verde) después de inyectar los liposomas por vía intravenosa (barra de escala: 50 μm);

la Figura 7 muestra una micrografía confocal de la absorción de liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en un tumor pancreático en un ratón RIP1-Tag2. Los vasos se tiñeron por perfusión con lectina fluorescente de *Lycopersicum esculentum* (verde) después de inyectar los liposomas por vía intravenosa (barra de escala: 50 μm);

la Figura 8 muestra una micrografía confocal de la absorción de liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en un tumor pancreático en un ratón RIP1-Tag2. Los vasos se tiñeron por perfusión con lectina fluorescente de *Lycopersicum esculentum* (verde) después de inyectar los liposomas por vía intravenosa. Los sitios posibles de crecimiento de vasos tienen una absorción intensa (barra de escala: 50 μm);

la Figura 9 muestra una micrografía confocal que muestra la escasa absorción de liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en vasos sanguíneos normales en la tráquea de un ratón exento de patógenos; los vasos se tiñeron de verde con una lectina fluorescente (barra de escala: 50 μm);

la Figura 10 muestra una micrografía confocal de la absorción de los liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas (rojo-anaranjado) en vasos sanguíneos angiogénicos en la tráquea de un ratón con infección de *Mycoplasma pulmonis* (barra de escala: 50 μm);

la Figura 11 es un gráfico que muestra el grado de absorción de los liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas por los vasos sanguíneos de tráqueas de ratón exento de patógenos (normal) e infectado con *Mycoplasma pulmonis* evaluada por medida de la intensidad de fluorescencia de los liposomas 4 horas después de la inyección

intravenosa. Las medidas se realizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 410. Los ratones infectados se inocularon por vía intranasal con organismos de *M. pulmonis* y se examinaron 4 semanas después. El asterisco designa una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$, valor medio $\pm$ SE, $n = 4$ ratones por grupo);

la Figura 12 es una micrografía electrónica de transmisión que muestra liposomas DOTAP:colesterol asociados con una célula endotelial en la tráquea de un ratón infectado con *M. pulmonis* (barra de escala: 50 μ m); y

la Figura 13 es una micrografía electrónica de transmisión que muestra liposomas DOTAP:colesterol absorbidos por una célula endotelial en la tráquea de un ratón infectado con *M. pulmonis* (barra de escala: 80 μ m).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Antes de describir el método presente de afectar selectivamente a las células angiogénicas endoteliales y los liposomas utilizados en el método, debe entenderse que esta invención no está limitada a los liposomas o métodos particulares descritos, dado que los mismos pueden, por supuesto, variar. Debe entenderse que la terminología utilizada en esta memoria tiene solamente por objeto describir realizaciones particulares.

Debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un/una”, “y” y “el/la” incluyen referentes plurales a no ser que los contextos indiquen claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “un liposoma” incluye mezclas y grandes números de tales liposomas, la referencia a “un agente” incluye grandes números de agentes y mezclas de los mismos, y la referencia a “el método” incluye uno o más métodos o pasos del tipo descrito en esta memoria.

Las publicaciones expuestas en esta memoria se proporcionan únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo contenido en esta memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a retrotraerse a dicha publicación en virtud de invención previa.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

Definiciones

Los términos “tratamiento”, “terapia”, “tratar” y análogos se utilizan en esta memoria para significar generalmente la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o curación parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, tal como se utiliza en esta memoria abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye:

(a) prevenir que la enfermedad o síntoma se presente en un individuo que puede ser propenso a la enfermedad o síntoma pero no se le ha diagnosticado todavía dicho padecimiento;

(b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o

(c) aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad o síntoma.

El término “angiogénesis” hace referencia a un proceso de vascularización tisular que implica el desarrollo de nuevos vasos. La angiogénesis ocurre por uno de tres mecanismos: (1) neovascularización, donde las células endoteliales migran fuera de los vasos pre-existentes comenzando la formación de nuevos vasos; (2) vasculogénesis, donde los vasos se producen a partir de células precursoras *de novo*; o (3) expansión vascular, donde pequeños vasos existentes aumentan en diámetro para formar vasos mayores (Blood, C.H. y Zetter, B.R., 1990, *Biochem. Biophys. Acta*, 1032: 89-118).

La angiogénesis es un proceso importante en los procesos normales de crecimiento neonatal y en el sistema reproductor femenino durante el ciclo de desarrollo del cuerpo lúteo (véase Moses, M.A., *et al.*, 1990, *Science* 248: 1408-10). En condiciones normales, todos los procesos que implican la nueva formación o la remodelización de vasos sanguíneos existentes o nuevos es un proceso auto-limitante, y la expansión de los tipos específicos de células está controlada y concertada.

La angiogénesis está involucrada también en la curación de las heridas y en la patogénesis de un gran número de enfermedades clínicas que incluyen inflamación tisular, artritis, asma, crecimiento de tumores, retinopatía diabética, y otras afecciones. Se hace referencia a las manifestaciones clínicas asociadas con angiogénesis como enfermedades angiogénicas (Folkman, J. y Klagsburn, M., 1987, *Science*, 235: 442-7).

Muchos experimentos han sugerido que los tejidos pueden producir factores angiogénicos que promueven la angiogénesis en condiciones de suministro deficiente de sangre durante condiciones tanto normales como patológicas. Estos factores y compuestos difieren en especificidad celular y en los mecanismos por los cuales inducen el crecimiento de

nuevos vasos sanguíneos. Estos factores funcionan por una diversidad de mecanismos. Por ejemplo, aquéllos pueden inducir la migración y proliferación de células endoteliales o estimular la producción de colagenasa (véase Klagsburn, M., y D'Amore, P.A., 1991, "Regulators of angiogenesis", *Ann. Rev. Physiol.* 53: 217-39). Existen numerosos bioensayos que permiten la determinación directa de actividades angiogénicas (Wilting, J., *et al.*, 1991, "A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effects of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF", *Anat. Embriol.* (Berl) 183: 259-71).

Se ha propuesto que los inhibidores angiogénicos pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la interferencia con la angiogénesis puede restringir el crecimiento de los tumores. Han sido propuestos varios medios para inhibir la angiogénesis, que incluyen (1) inhibición de la liberación de factores angiogénicos, (2) neutralización de factores angiogénicos utilizando medios tales como anticuerpos monoclonales, y (3) inhibición de las respuestas de las células endoteliales (Folkman, J., *et al.*, 1992, *Seminars in Cancer Biology* 3: 89-96), mediante el uso de factores anti-angiogénicos, moléculas que se sabe inhiben la angiogénesis. Varios inhibidores de las células endoteliales de este tipo han sido descritos, tales como el inhibidor de colagenasa, inhibidores de la reposición de las membranas basales, esteroides angiostáticos, inhibidores derivados de hongos, el factor 4 de las plaquetas, trombospondina, fármacos contra la artritis tales como penicilamina, y alfa-interferón, entre otros (véase Folkman, J., *et al.*, 1992, *Seminars in Cancer Biology* 3: 89-96; para ejemplos, véanse: Stepien, H., *et al.*, 1996, "Inhibitory effects of fumagillin and its analogue TNP-470 on the function, morphology, and angiogenesis of an oestrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats", *J. Endocrinol.* 150:99-106; Maione, T.E., *et al.*, 1990, "Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides", *Science* 247: 77-9).

El término "células endoteliales" significa aquellas células que constituyen el endotelio, la monocapa de células escamosas simples que reviste la superficie interna del sistema circulatorio. Estas células retienen capacidad de división celular, aunque proliferan muy lentamente en condiciones normales, sufriendo división celular quizás una sola vez al año. La proliferación de las células endoteliales puede demostrarse utilizando [³H]-timidina para marcar células en la fase S. En los vasos normales, la proporción de células endoteliales que llegan a marcarse es especialmente alta en puntos de ramificación de las arterias, donde la turbulencia y el desgaste parecen estimular la renovación. (Goss, R.J., 1978, *The Physiology of Growth*, Academic Press, Nueva York, pp. 120-137). Las células endoteliales normales están en reposo, es decir no se dividen y como tales pueden distinguirse de las células angiogénicas endoteliales como se expone más adelante.

Las células endoteliales tienen también capacidad de migrar, un proceso importante en la angiogénesis. Las células endoteliales forman nuevos capilares *in vivo* cuando hay necesidad de los mismos, por ejemplo durante la reparación de heridas o cuando se percibe necesidad de aquéllos como ocurre en la formación de tumores. La formación de nuevos vasos se conoce como angiogénesis, e implica moléculas (factores angiogénicos) que pueden ser mitógenas o quimioatrativas para las células endoteliales (Klagsburn, *supra*). Durante la angiogénesis, las células endoteliales pueden migrar fuera de un capilar existente para comenzar la formación de un nuevo vaso, es decir, las células de un vaso migran de una manera que permite la extensión de dicho vaso (Speidel, C.C., *Am. J. Anat.* 52: 1-79). Estudios *in vitro* han documentado tanto la proliferación como la migración de células endoteliales; las células endoteliales puestas en cultivo pueden proliferar y desarrollar espontáneamente tubos capilares (Folkman, J., Haudenschild, C., 1980, *Nature* 288: 551-56).

Las expresiones "células angiogénicas endoteliales" y "células endoteliales que sufren angiogénesis" y análogas se utilizan intercambiamente en esta memoria para significar células endoteliales (como se ha definido arriba) que sufren angiogénesis (como se ha definido arriba). Así, las células angiogénicas endoteliales son células endoteliales que están proliferando a una velocidad muy superior a la condición normal de sufrir división celular aproximadamente una vez al año. La velocidad de diferenciación respecto a la proliferación normal de las tasas endoteliales puede ser 2x, 5x o 10x o más que la de proliferación normal y puede variar notablemente dependiendo de factores tales como la edad y el estado del paciente, el tipo de tumor implicado, el tipo de herida, etc. Con tal que la diferencia en el grado de proliferación entre las células endoteliales normales y las células angiogénicas endoteliales pueda medirse y se considere biológicamente importante, entonces los dos tipos de células pueden ser diferenciados por la presente invención, es decir, las células angiogénicas endoteliales pueden ser diferenciadas de las células endoteliales normales en reposo correspondientes en términos de fijación preferente de liposomas catiónicos.

Las expresiones "células endoteliales correspondientes", "células endoteliales normales o en reposo" y análogas se utilizan con objeto de hacer referencia a células endoteliales normales en reposo contenidas en el mismo tipo de tejido (en condiciones normales) cuando algunas de las células endoteliales están sufriendo angiogénesis y algunas de las células endoteliales se encuentran en reposo. En el contexto de la presente invención, las células angiogénicas endoteliales están direccionadas preferentemente y están direccionadas con una preferencia que es 5 veces, o preferiblemente 10 veces mayor que el direccionamiento de las células endoteliales correspondientes en reposo.

El término "lípidos" se utiliza en su sentido convencional como un término genérico que abarca grasas, lípidos, los constituyentes del protoplasma solubles en alcohol-éter, que son insolubles en agua. Los lípidos comprenden las grasas, aceites grasos, aceites esenciales, ceras, esteroides, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, sulfolípidos, amino-lípidos, cromolípidos (lipocromos), y ácidos grasos. El término abarca lípidos tanto existentes naturalmente como producidos por síntesis. Lípidos preferidos en conexión con la presente invención son: fosfolípidos, con inclusión de fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, y esfingomielinas. En los casos en que se trata de ácidos grasos, los mismos podrían tener una longitud de 12-24 carbonos, conteniendo hasta 6 insaturaciones (enlaces dobles), y estar enlazados

a la cadena principal por enlaces acilo o éter. Donde existe más de un ácido graso enlazado a la cadena principal, los ácidos grasos podrían ser diferentes (asimétricos), o podría estar presente una sola cadena de ácido graso, v.g. en las lisolecitinas. Son también posibles formulaciones mixtas, particularmente cuando los lípidos no catiónicos se derivan de fuentes naturales, tales como lecitinas (fosfatidilcolinas) purificadas a partir de yema de huevo, corazón, cerebro o hígado de bovino, o soja. Los esteroides y esteroides, particularmente el colesterol, y esteroides sustituidos en la posición 3b.

El término “lípidos catiónicos” se utiliza en esta memoria para abarcar cualquier lípido de la invención (como se ha definido arriba) que es catiónico. El lípido se determinará como catiónico cuando el lípido tiene una carga positiva (al pH fisiológico) tal como puede medirse por instrumentación utilizada en el momento de la medida. En los casos en que existen ácidos grasos presentes en el lípido catiónico, los mismos pueden tener una longitud de 12-24 carbonos, conteniendo hasta 6 insaturaciones (enlaces dobles), y estar unidos a la cadena principal por enlaces acilo o éter; podría existir también una sola cadena de ácido graso enlazada a la cadena principal. Donde existe más de un ácido graso enlazado a la cadena principal, los ácidos grasos podrían ser diferentes (asimétricos). Son también posibles formulaciones mixtas.

El término “liposoma” abarca cualquier compartimiento cerrado por una bicapa lipídica. Se hace también referencia a los liposomas como vesículas lipídicas. Para formar un liposoma, las moléculas lipídicas comprenden porciones alargadas no polares (hidrófobas) y porciones polares (hidrófilas). Las porciones hidrófobas e hidrófilas de la molécula se posicionan preferiblemente en dos extremos de una estructura molecular alargada. Cuando dichos lípidos se dispersan en agua, forman espontáneamente membranas bicapa a las que se hace referencia como laminillas. Las laminillas están compuestas de dos hojas de monocapa de moléculas lipídicas con sus superficies no polares (hidrófobas) enfrentadas una a otra y sus superficies polares (hidrófilas) enfrentadas al medio acuoso. Las membranas formadas por los lípidos encierran una porción de la fase acuosa de una manera similar a la de una membrana celular que encierra los contenidos de una célula. Así, la bicapa de un liposoma tiene semejanzas a una membrana celular sin los componentes proteínicos presentes en una membrana celular. Tal como se utiliza en conexión con la presente invención, el término liposoma incluye liposomas multilaminares, que tienen generalmente un diámetro comprendido en el intervalo de 1 a 10 micrómetros y comprenden cualquier número entre 2 y centenares de bicapas lipídicas concéntricas que alternan con capas de una fase acuosa, e incluye también vesículas unilaminares que están constituidas por una sola capa lipídica y tienen generalmente un diámetro de 20 a 100 nanómetros, vesículas que pueden producirse sometiendo los liposomas multilaminares a ultrasonidos.

Los liposomas preferidos podrían ser vesículas unilaminares pequeñas (SUVs) que tienen una sola bicapa lipídica, y un diámetro en el intervalo de 25-200 nm.

Los liposomas catiónicos pueden definirse funcionalmente por tener un potencial zeta mayor que 0 mV.

El término “liposoma catiónico”, tal como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto abarcar cualquier liposoma como se define arriba que es catiónico. El liposoma se determina como catiónico cuando está presente al pH fisiológico. Debe indicarse que el liposoma propiamente dicho es la entidad que se determina como catiónica, lo que significa que el liposoma que tiene una carga positiva medible a su pH fisiológico puede, en un entorno *in vivo*, llegar a unirse a otras sustancias. Dichas otras sustancias pueden estar cargadas negativamente y dar con ello como resultado la formación de una estructura que no tiene una carga positiva. La carga y/o estructura de un liposoma de la invención presente en un entorno *in vivo* no ha sido determinada con precisión. Sin embargo, de acuerdo con la invención, un liposoma catiónico de la invención se producirá utilizando al menos algunos lípidos que son en sí mismos catiónicos. El liposoma no precisa estar constituido completamente por lípidos catiónicos, pero debe comprender una cantidad suficiente de un lípido catiónico tal que cuando se forma el liposoma y se pone en el interior de un entorno *in vivo* al pH fisiológico, el liposoma tiene inicialmente una carga positiva.

El término “se asocia con” hace referencia a la acción de los liposomas catiónicos de la invención que se mantienen en proximidad suficientemente estrecha a células angiogénicas endoteliales durante periodos de tiempo suficientemente largos tales que el liposoma y/o su contenido entran en la célula endotelial. Los liposomas de la invención pueden asociarse con células angiogénicas endoteliales en una diversidad de circunstancias pero, muy preferiblemente, se asocian con la célula angiogénica endotelial cuando se encuentran en condiciones *in vivo*. Así, el liposoma puede estar modificado por la unión, fijación o asociación de otras moléculas o materiales presentes en el torrente sanguíneo antes de la asociación con la célula angiogénica endotelial. Una diversidad de fuerzas pueden ser responsables de la asociación de los liposomas con células angiogénicas endoteliales tales como las interacciones inespecíficas que ocurren entre dos moléculas cualesquiera no relacionadas, es decir, otras macromoléculas tales como seroalbúmina humana y transferrina humana. Estas fuerzas intermoleculares pueden clasificarse en cuatro áreas generales que son (1) electrostáticas; (2) enlaces de hidrógeno; (3) hidrófobas; y (4) de Van der Waals. Las fuerzas electrostáticas se deben a la atracción entre grupos iónicos con cargas opuestas tales como entre grupos cargados opuestamente en un liposoma catiónico y grupos presentes en la superficie o en el interior de la célula angiogénica endotelial. La fuerza de atracción (F) es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia (d) entre las cargas. Las fuerzas de enlaces de hidrógeno son proporcionadas por la formación de puentes de hidrógeno reversibles entre grupos hidrófilos. Los liposomas de la invención pueden incluir grupos hidrófilos tales como -COOH y pueden estar presentes grupos similares en la superficie de las células endoteliales al igual que pueden estarlo los grupos -OH, -NH₂. Estas fuerzas dependen en gran parte del posicionamiento estrecho de dos moléculas portadoras de estos grupos. Las fuerzas hidrófobas operan del mismo modo que las gotitas de aceite en agua se fusionan para formar una sola gota de mayor tamaño. De

acuerdo con ello, los grupos hidrófobos no polares tal como están presentes en los liposomas de la invención tienden a asociarse en un entorno acuoso y pueden tender a asociarse con grupos hidrófobos presentes en la superficie de las células endoteliales. Por último, las fuerzas de Van der Waals se crean entre moléculas que dependen de interacciones entre las nubes electrónicas externas.

La expresión “se asocia selectivamente” y “se direcciona selectivamente” y análogas se utilizan en esta memoria para describir una propiedad de los liposomas catiónicos de la invención que causa que los liposomas catiónicos se asocien con células angiogénicas endoteliales en un grado mayor que aquél con el que los liposomas catiónicos se asocian con las células endoteliales normales correspondientes no implicadas en angiogénesis. De acuerdo con la invención, asociación selectiva o preferencial significa que el liposoma se asociará en un grado cinco veces mayor o más con las células endoteliales que sufren angiogénesis en comparación con las células endoteliales normales correspondientes que no sufren angiogénesis. Más preferiblemente, la asociación preferible o selectiva indica una selectividad diez veces mayor o más entre las células angiogénicas endoteliales y las células endoteliales normales correspondientes.

El término “cáncer” hace referencia a una enfermedad de proliferación celular inadecuada. Esta perturbación es muy evidente clínicamente cuando el volumen de tejido tumoral pone en riesgo la función de órganos vitales. Los conceptos que describen el crecimiento tisular normal son aplicables al tejido maligno dado que los tejidos normales y malignos pueden compartir características de crecimiento similares, tanto a nivel de la célula individual como al nivel del tejido. El cáncer es tanto una enfermedad de regulación desordenada del crecimiento tisular como de regulación desordenada del crecimiento celular. El tiempo de duplicación hace referencia al tiempo requerido para que un tejido o tumor se duplique en tamaño o número de células. El tiempo de duplicación de un tumor clínicamente evidente es usualmente considerablemente mayor que el tiempo del ciclo celular de las células de las que está compuesto el tumor. Sin embargo, al contrario que un tumor, el hígado, el corazón o los pulmones normales en un adulto no tienen un tiempo de duplicación dado que los órganos se encuentran en estado estacionario, de tal manera que las velocidades de producción celular y muerte celular son iguales (Stockdale, F., 1996, “Cancer growth and chemotherapy”, en: *Scientific American Medicine*, vol. 3, Scientific American Press, Nueva York, pp. 12-18). Las características de crecimiento de los tumores son tales que la producción de células nuevas excede a la muerte celular; un suceso neoplástico tiende a producir un aumento en la proporción de células madre que sufren auto-renovación y una disminución correspondiente en la proporción que progresa hasta la maduración (McCulloch, E.A., *et al.*, 1982, “The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia (AML)”, *Blood* 59: 601-608). Para cada población tumoral, existe un tiempo de duplicación y puede establecerse una curva específica de crecimiento (Stockdale, F., *supra*). El patrón de crecimiento de los tumores puede describirse por una curva de Gompertz (Steel, GG, 1977, *Growth kinetics of tumors*, Oxford University Press, Inc., Nueva York, p. 40), que indica que durante el desarrollo de un tumor la velocidad de crecimiento es inicialmente muy rápida y decrece luego progresivamente a medida que aumenta el tamaño.

Aspectos generales de la invención

Las figuras adjuntas proporcionan una representación visual clara de la manera altamente selectiva en la que los liposomas catiónicos de la invención están direccionados a las células angiogénicas endoteliales. Una realización básica de la invención implica un método de afectar selectivamente a las células angiogénicas endoteliales por administración (preferiblemente por inyección intravascular, más preferiblemente inyección intraarterial) de una formulación que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y liposomas catiónicos que contienen un compuesto tóxico. Los liposomas catiónicos dentro de la formulación inyectada se dejan entrar luego en las células angiogénicas endoteliales (por endocitosis) que revisten las paredes de los vasos sanguíneos angiogénicos. Los liposomas catiónicos se asocian con las células angiogénicas endoteliales durante un periodo de tiempo suficiente y de una manera tal que los liposomas propiamente dichos y/o los contenidos de los liposomas entran en la célula angiogénica endotelial. Después de ello, el compuesto que entra en la célula puede inhibir o promover la angiogénesis o proporcionar meramente un marcador que permite la detección del sitio de angiogénesis. La selectividad del direccionamiento de las células angiogénicas endoteliales puede comprenderse mejor haciendo referencia a las figuras adjuntas.

La Figura 1 muestra una porción de un ovario de ratón que tiene un gran folículo redondo (en amarillo) posicionado en el mismo. Dado que la angiogénesis está ocurriendo dentro de un ovario de ratón normal, los liposomas catiónicos que contienen un marcador detectable se asocian con las células angiogénicas endoteliales de los vasos sanguíneos del folículo en crecimiento (rojo-anaranjado). No obstante, en la Figura 1 no es posible determinar claramente si el marcador está asociado únicamente con las células angiogénicas endoteliales o si el mismo está asociado con la totalidad del tejido dentro del ovario y el folículo.

La Figura 2 es una micrografía de fluorescencia que muestra una sección de un tumor pancreático de un ratón que fue inyectado por vía intravenosa con liposomas catiónicos (rojo-anaranjado) de la invención que contenían un marcador detectable. La angiogénesis ocurre fácilmente dentro de los tumores. Así, esta fotografía proporciona cierta indicación de que los liposomas catiónicos (rojo-anaranjado) de la invención se asocian específicamente con las células angiogénicas endoteliales (verde). Sin embargo, estos resultados no demuestran espectacularmente la especificidad de la invención.

Una comparación de las Figuras 3 y 4 demuestra la capacidad de la invención para localizar un sitio de angiogénesis. La Figura 3 es una fotografía que muestra vasos sanguíneos dentro del tejido pancreático normal de un ratón.

Existe mucha menos marcación de las células endoteliales normales que la correspondiente a las células angiogénicas endoteliales. Esto se demuestra claramente por comparación de la Figura 3 con la Figura 4 que es una fotografía de un tumor pancreático en un ratón. la Figura 4 muestra claramente un alto grado de acumulación del marcador (amarillo-anaranjado) contenido dentro de los liposomas catiónicos en el área de un tumor. La diferencia espectacular entre las

Figuras 3 y 4 indica la utilidad de la presente invención para marcar claramente y con precisión el sitio de un tumor. Sin embargo, dado que una proporción tan grande del marcador está asociada con los vasos sanguíneos angiogénicos en la Figura 4, no puede ser posible apreciar en toda su extensión la especificidad de los liposomas catiónicos para direccionarse preferentemente a las células angiogénicas endoteliales.

la Figura 5 es una fotografía de vasos sanguíneos (verde) en un islote pancreático de ratón normal. La pequeña cantidad de coloración rojo-anaranjada indica la asociación limitada de los liposomas catiónicos con las células endoteliales normales que revisten los vasos sanguíneos del tejido pancreático.

La especificidad de los liposomas catiónicos que contienen un marcador detectable se muestra más claramente por comparación de la Figura 5 con la Figura 6. la Figura 6 muestra claramente un grado mucho mayor de acumulación del marcador en las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos del tumor en el interior del páncreas de un ratón.

La capacidad exacta de los liposomas catiónicos para direccionarse a las células angiogénicas endoteliales se muestra espectacularmente en las Figuras 7 y 8. la Figura 7 muestra claramente que el marcador fluorescente se asocia sólo con los vasos sanguíneos, es decir, el marcador no se escapa o migra al tejido circundante. La especificidad se muestra del modo más espectacular en la Figura 8, que está enfocada claramente en los liposomas catiónicos marcados detectados en el interior de células angiogénicas endoteliales, demostrando que el marcador es específico para dichas células y no se escapa o migra al tejido circundante.

Las Figuras 9 y 10 demuestran el mismo efecto arriba descrito pero con un modelo de angiogénesis diferente. Las Figuras 1 a 8 estaban dirigidas todas a tejido normal o canceroso. Las Figuras 9 y 10, respectivamente, muestran tejido normal e inflamado de la tráquea de un ratón. Más específicamente, la Figura 9 muestra los vasos sanguíneos normales de una tráquea, es decir, una tráquea de ratón exenta de patógenos. la Figura 10 muestra los vasos sanguíneos de una tráquea en el caso de existencia de angiogénesis inducida por infección. Es evidente la mayor concentración del marcador detectable en la Figura 10, indicando que los liposomas catiónicos de la invención se asocian selectivamente con las células angiogénicas endoteliales - asociándose específicamente con las células endoteliales de la tráquea que ha sido inducida a angiogénesis por una infección.

La Figura 11 es un gráfico que representa la diferencia en la especificidad de los liposomas catiónicos entre su capacidad para asociarse con las células angiogénicas endoteliales y las células endoteliales normales correspondientes que no sufren angiogénesis. Como se muestra en la Figura 11, los liposomas catiónicos de la invención (por este experimento) han demostrado una afinidad aproximadamente 10 veces mayor para las células angiogénicas endoteliales en comparación con las células endoteliales correspondientes que no sufren angiogénesis.

Por último, las Figuras 12 y 13 muestran de qué modo los liposomas catiónicos de la invención entran en las células angiogénicas endoteliales. En la Figura 12, los liposomas catiónicos han establecido contacto con la superficie de la célula angiogénica endotelial. En la Figura 13, los liposomas catiónicos han entrado en la célula angiogénica endotelial por endocitosis y están presentes en el interior de la célula.

Una vez que se ha expuesto verbalmente y se ha demostrado por medio de figuras la especificidad de los liposomas catiónicos de la invención, los expertos en la técnica podrán producir una diversidad de liposomas catiónicos diferentes que contienen una diversidad de compuestos tóxicos diferentes a fin de hacer uso de la invención. Sin embargo, para completar la misma, se da a continuación una descripción de liposomas catiónicos y sus métodos de fabricación, seguida por una descripción de sustancias que inhiben o promueven la angiogénesis.

Liposomas

Los liposomas pueden formarse fácilmente poniendo lípidos (como se han definido arriba) que incluirán lípidos catiónicos (como se han definido arriba) en solución acuosa y agitando la solución durante un periodo de tiempo de varios segundos a varias horas. El procedimiento simple produce espontáneamente liposomas o vesículas grandes, multilaminares, con diámetros comprendidos en el intervalo de aproximadamente 1 a 10 micrómetros. Estos liposomas están constituidos por dos a varios centenares de bicapas lipídicas concéntricas que pueden alternar con capas de la fase acuosa dentro de la cual estaban presentes los lípidos. Una sustancia tal como un compuesto que inhibe la angiogénesis, promueve la angiogénesis o proporciona un marcador detectable puede incluirse dentro de la fase acuosa. La sustancia es preferiblemente soluble en agua o puede, al menos, dispersarse fácilmente en agua.

El espesor de la capa acuosa y por consiguiente la cantidad total de fase acuosa atrapada en el interior del liposoma, depende del balance de las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los lípidos cargados y las fuerzas atractivas de Van der Waals entre las bicapas como un todo. Así, la separación acuosa (y por consiguiente el volumen de material acuoso atrapado) aumenta con la proporción creciente de lípidos cargados en la membrana y con las concentraciones decrecientes de electrolitos (iones cargados) en la fase acuosa. Los liposomas o vehículos de pequeño tamaño formados son unilaminares y tienen un tamaño comprendido en el intervalo de aproximadamente 20 a 100 nanómetros, y

pueden producirse sometiendo las vesículas multi-laminares a ultrasonidos. Pueden obtenerse liposomas unilaminares mayores que tienen un tamaño comprendido en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1 μ m de diámetro, cuando el lípido se solubiliza en un disolvente orgánico o un detergente y el agente solubilizado se separa por evaporación o diálisis, respectivamente. La fusión de liposomas unilaminares más pequeños por métodos que requieren lípidos particulares o condiciones severas de deshidratación-hidratación puede proporcionar vasos unilaminares tan grandes o mayores que las células.

Con objeto de formar los liposomas catiónicos de la invención, es necesario que los liposomas se produzcan utilizando al menos algún lípido catiónico. Sin embargo, los liposomas catiónicos de la invención no precisan estar constituidos enteramente por lípidos catiónicos. Por ejemplo, la utilización de lípidos neutros en una cantidad de aproximadamente 45% y lípidos catiónicos en una cantidad de aproximadamente 55%, proporcionará lípidos catiónicos que son útiles en conexión con la invención y están direccionados preferentemente a las células angiogénicas endoteliales.

La composición de los liposomas catiónicos con una sustancia que afecta a la angiogénesis y/o un marcador incluye la preparación de liposomas en la cual los liposomas se preparan de acuerdo con tecnología estándar por la cual, por ejemplo, se mezclan soluciones de cloruro de 1-{2-(9(Z)-octadecenoiloxi)etil}-2-(8(Z)-heptadecenil)3-(2-hidroxi)etilimidazolinio (DOTAP), colesterol, y Rojo Texas DHPE, se evaporan a sequedad y la película lipídica se rehidrata subsiguientemente en dextrosa al 5% para producir vesículas multi-laminares. Estas vesículas se extruyen a través de filtros de membrana de policarbonato para proporcionar vesículas unilaminares. Los liposomas y la sustancia a incorporar, por ejemplo DNA plasmídico, se mezclan juntos en relaciones específicas en una solución de dextrosa al 5% u otro excipiente fisiológicamente aceptable. Lípidos catiónicos útiles incluyen: DDAB, bromuro de dimetildioctadecil-amonio [disponible de Avanti Polar Lipids y Sigma Chemical Company], 1,2-diacil-3-trimetilamonio-propanos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOTAP), dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil) [todos los cuales están disponibles de Avanti Polar Lipids], 1,2-diacil-3-dimetilamonio-propanos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil, dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil) [todos los cuales están disponibles de Avanti Polar Lipids] DOTMA, cloruro de N-[1-[2,3-bis(oleoiloxi)]propil]-N,N,N-trimetilamonio, DOGS, dioctadecilamidoglicil-permina [disponible de Promega Corporation] DC-colesterol, 3 β -[N-(N',N'-dimetil-aminoetano)carbamoil]colesterol DOSPA, 2,3-dioleoiloxi-N-(2(esperminacarboxamido)-etil)-N,N-dimetil-1-propanami-niotrifluoroacetato, 1,2-diacil-sn-glicero-3-etilfosfo-colinas (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOEPC), dilauroil, dimiristoil, dipalmitoil, diestearoil, palmitoil-oleoil) [todas las cuales están disponibles de Avanti Polar Lipids], β -alanil-colesterol, CTAB, bromuro de cetil-trimetil-amonio, diC14-amidina, N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilaminopropionamidina, 14Dea2, cloruro de O,O'-ditetradecanolil-N-(trimetil-aminoacetil)-dietanolamina, yoduro de (N,N,N',N'-tetra-metil-N,N'-bis(2-hidroxi)etil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butano-diamonio [disponible de Promega Corporation], derivados de cloruro de 1-[2-aciloxi)etil]2-alquil-(alquenil)-3-(2-hidroxi)etilimidazolinio tales como cloruro de 1-[2-(9(Z)-octadecenoiloxi)etil]-2-(8(Z)-heptadecenil-3-(2-hidroxi)etilimidazolinio (DOTIM), cloruro de 1-[2-(hexadecanoiloxi)etil]-2-pentadecil-3-(2-hidroxi)etilimi-dazolinio (DPTIM), cloruro de 1-[2-tetradecanoiloxi)-etil]-2-tridecil-3-(2-hidroxi)etilimidazolinio (DMTIM) - estos tres lípidos se describen en Solodín *et al.*, Biochem 43, 13537-13544, 1995. Éste es de Tim Heath's Lab en Wisconsin; Megabios han adquirido las patentes para algunas de sus invenciones de lípidos.

Derivados de compuestos de 2,3-dialquiloxipropil-amonio cuaternario, que contienen un resto hidroxialquilo en la amina cuaternaria, tales como:

- bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxi)etil-amonio (DORI);
- bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)etil-amonio (DORIE);
- bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)propil-amonio (DORIE-HP);
- bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)butil-amonio (DORIE-HB);
- bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)pentil-amonio (DORIE-HPe);
- bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)etil-amonio (DMRIE);
- bromuro de 1,2-dipalmitiloxipropil-3-dimetil-hidroxi)etil-amonio (DPRIE);

bromuro de 1,2-disteriloxipropil-3-dimetil-hidroxi)etil-amonio (DSRIE) - estos lípidos fueron desarrollados por Vical, Felgner *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561, 1994.

Los liposomas catiónicos se preparan a partir de los lípidos catiónicos propiamente dichos, o en mezcla con otros lípidos, particularmente lípidos neutros tales como:

Cholesterol

1,2-diacil-sn-glicero-fosfoetanolaminas (con inclusión, pero sin carácter limitante, de dioleoil (DOPE)); una gran familia de derivados está disponible de Avanti Polar Lipids);

1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolinas (una gran familia de derivados está disponible de Avanti Polar Lipids);

N.B. Podrían incluirse ácidos grasos asimétricos, tanto sintéticos como naturales, y formulaciones mixtas, para los diacil-derivados anteriores.

Liposomas del tipo arriba descrito y de otros tipos que pueden ser ideados por los expertos en la técnica pueden utilizarse en la presente invención con los liposomas que contienen una sustancia que promueve o inhibe la angiogénesis y/o incluye un marcador detectable. Un ejemplo de liposomas de la invención son liposomas catiónicos que contienen una sustancia soluble en lípidos o soluble en agua que inhibe la angiogénesis. Sin embargo, los compuestos solubles en lípidos pueden encontrarse en la bicapa lipídica. Lo que sigue proporciona una descripción de inhibidores de la angiogénesis. Sin embargo, debe indicarse que otros serán ideados por los expertos en la técnica y/o serán desarrollados con posterioridad a la presente invención, y que tales inhibidores de la angiogénesis podrían ser utilizados fácilmente en conexión con la presente invención.

Dosificación

La cantidad de inhibidor o promotor de la angiogénesis administrada a un paciente (que puede ser cualquier animal con un sistema circulatorio que contenga células endoteliales que sufren angiogénesis) variará dependiendo de una extensa gama de factores. Por ejemplo, sería necesario proporcionar dosis sustancialmente mayores a los humanos que a animales más pequeños. La cantidad de inhibidor o promotor de la angiogénesis dependerá del tamaño, la edad, el sexo, el peso y la condición del paciente así como de la potencia de la sustancia que se administre. Una vez indicado que existe una variabilidad considerable en términos de dosificación, se cree que los expertos en la técnica pueden, utilizando la presente exposición, determinar fácilmente la dosificación apropiada administrando primeramente cantidades extremadamente pequeñas y aumentando progresivamente la dosis hasta que se obtienen los resultados deseados. Aunque la cantidad de dosis variará notablemente sobre la base de factores como los arriba descritos, en general, la presente invención hace que sea posible administrar cantidades sustancialmente menores de cualquier sustancia en comparación con los sistemas de suministro que están direccionados al tejido circundante, v.g., direccionados a las células tumorales propiamente dichas.

Modelos experimentales de angiogénesis

La presente invención fue facilitada por el uso de modelos de angiogénesis en roedores. Enfermedades inflamatorias crónicas tales como asma y bronquitis inducen la remodelización tisular y vascular en la mucosa de las vías respiratorias. Para comprender mejor la patogénesis de la inflamación crónica de las vías respiratorias, se utilizó un modelo en el cual ocurren inflamación crónica y remodelización tisular en las tráqueas de ratas y ratones. La angiogénesis se desarrolla en la mucosa de las vías respiratorias como resultado de la infección de *Mycoplasma pulmonis*. En este modelo, los organismos *Mycoplasma pulmonis* causan una infección persistente en el epitelio traqueal y bronquial. La mucosa de las vías respiratorias de las ratas infectadas con *M. pulmonis* presenta varias anormalidades diferenciadas: 1) engrosamiento del epitelio y la lámina propia; 2) cambios en la composición celular del epitelio; 3) angiogénesis; 4) sensibilidad incrementada de los vasos angiogénicos para la sustancia P mediadora de inflamación en términos de fuga de plasma; 5) fuga inducida por la sustancia P de los capilares así como de las vénulas; y 6) número incrementado de receptores para la sustancia P (receptores NK1) sobre las células endoteliales capilares. En este modelo, la angiogénesis es activada por la inflamación crónica, y los vasos sanguíneos son más sensibles a los mediadores de inflamación.

Estudios que utilizaban perfusión de lectinas para teñir la superficie luminal de las células endoteliales revelaron la magnitud de la angiogénesis en las ratas después de la infección por *M. pulmonis*. En la mucosa traqueal de las ratas infectadas están presentes numerosos vasos semejantes a capilares, y estos vasos sufren fuga después de la inyección intravenosa de la sustancia P mediadora de inflamación.

En los ratones, *M. pulmonis* causa una inflamación pulmonar aguda que alcanza su máximo 6-9 días después de la inoculación, seguido por infección persistente de las vías respiratorias. La respuesta de los ratones a la infección por *M. pulmonis* es muy dependiente de la variedad; por ejemplo, las variedades C3H exhiben mayor mortalidad y mayor reducción de la citoquina factor- α de necrosis tumoral que las variedades C57 BL. Algunos aspectos de la remodelización mucosal tales como hiperplasia epitelial, han sido descritos en las vías respiratorias de ratones infectados por *M. pulmonis*. En los ratones C57BL/6 infectados con inoculación nasal de *M. pulmonis*, el número de vasos traqueales aumenta espectacularmente, al parecer por crecimiento de nuevos capilares. En esta variedad, la vasculatura de la mucosa traqueal ya no es planar, y se desarrollan pequeños vasos perpendiculares al plano de la mucosa. Se encuentran numerosas ramificaciones vasculares evidentes en regiones de vascularidad incrementada. Así, la infección de los ratones C57BL/6 por *M. pulmonis* produce inflamación crónica de las vías respiratorias con proliferación endotelial, remodelización vascular, y angiogénesis. En contraste, en los ratones C3H/HeNcr infectados por inoculación nasal de *M. pulmonis*, el número de células endoteliales vasculares en la mucosa traqueal aumenta, pero el número de vasos no lo hace. La vascularidad incrementada no es debida a un aumento en la longitud o el número de vasos sino a un aumento en el diámetro de los vasos, y este aumento del diámetro en el tamaño de los vasos es debido a una duplicación del número de células endoteliales. El tamaño de las células endoteliales individuales en las tráqueas infectadas no aumenta significativamente. Los niveles de anticuerpos circulantes para *M. pulmonis* son similares en las dos variedades de ratones. Así pues, la infección de los ratones C3H/HeNcr por *M. pulmonis* produce una infección crónica de las vías respiratorias con remodelización vascular y proliferación endotelial, pero no

un aumento significativo en el número de vasos, mientras que en los ratones C57BL/6 produce proliferación celular y nuevos vasos.

En un segundo modelo, la angiogénesis se produce en tumores que son resultado de la expresión transgénica del oncogén viral SV40. El modelo de ratón transgénico “RIP-Tag” proporciona la oportunidad de estudiar los cambios fenotípicos en las células angiogénicas endoteliales en una progresión bien caracterizada desde tejido normal a tumores. En el modelo de ratón transgénico “RIP-Tag”, el oncogén del virus SV-40, antígeno T grande (Tag), es activado por una región del promotor de insulina de la rata (RIP). Cuando se inserta en el genoma murino, este constructo induce la expresión de Tag específicamente en las células β de los islotes pancreáticos, que están localizadas en aproximadamente 400 islotes dispersados por todo el páncreas. La totalidad de los islotes del páncreas en estos ratones expresan Tag; sin embargo, los islotes se desarrollan normalmente hasta una edad aproximada de 6 semanas. A partir de este momento, aproximadamente el 50% de los islotes se vuelven hiperplásticos. Sin embargo, de estos islotes hiperplásticos, una pequeña fracción (<5%) se desarrolla en tumores al cabo de aproximadamente 10 semanas. Este cuello de botella en la tumorigénesis parece resolverse cuando un islote adquiere la capacidad de inducir angiogénesis: por ello, esta fase de la tumorigénesis ha sido denominada el “cambio angiogénico”. Un cambio angiogénico similar parece existir también en otros modelos de tumorigénesis murina así como en varios tumores humanos. Así pues, el modelo RIP-Tag proporciona un entramado bien caracterizado para examinar la progresión de la angiogénesis en los tumores.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen con objeto de proporcionar a las personas con experiencia ordinaria en la técnica una exposición y descripción completas del modo de fabricar liposomas catiónicos y desarrollar la metodología para utilización de tales liposomas. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (v.g., cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio ponderal; la temperatura se expresa en grados Celsius; y la presión es la atmosférica o está próxima a la misma. Debe indicarse que cada uno de los ejemplos que siguen representa un número de experimentos que se realizaron, resumiéndose los procedimientos y resultados de los mismos. Será apreciado por los expertos en la técnica que no todos los experimentos proporcionaron resultados positivos. Sin embargo, se considera que lo que sigue refleja exactamente los resultados obtenidos.

Ejemplo 1

Distribución de Lípidos Catiónicos en Ratones Normales

Los liposomas y/o el DNA plasmídico se marcaron y se determinó la distribución celular de los complejos marcados en diversos momentos después de inyección intravenosa. Los experimentos se realizaron sobre ratones exentos de patógenos (peso corporal 20-25 g) de ambos sexos.

Se prepararon liposomas catiónicos pequeños de vesículas unilaminares a partir del lípido catiónico DDAB o DOTAP y el lípido neutro DOPE o colesterol, marcados con Rojo Texas o el tinte rojo fluorescente de carbocianina DiI o CM-DiI, y en algunos casos se complejaron con DNA plasmídico que contenía un gen informador tal como luciferasa o β -galactosidasa. Las células endoteliales se marcaron utilizando la lectina fluorescente de plantas fluorescente de *Lycopersicon esculentum*. Los monocitos/macrófagos se marcaron utilizando cuentas fluorescentes (Duke, 500 nm). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI, YO-PRO, o el tinte Hoechst 33342.

Los liposomas fluorescentes o complejos liposoma-DNA que contenían 10-60 μ g de DNA en hasta 300 μ l se inyectaron en ratones sin anestesiarse por la vía de la vena del rabo. En algunos experimentos, se inyectaron cuentas fluorescentes de 500 nm después de los complejos. Desde 5 minutos a 24 horas después, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y se perfundieron luego a través del ventrículo izquierdo con fijador (paraformaldehído al 1% en solución salina tamponada con fosfato) seguido por la lectina fluorescente para marcar la superficie endotelial de la vasculatura. Después de la perfusión, se extirparon los tejidos y se prepararon bien como montajes enteros o cortados en secciones utilizando un Vibrátomo o cortador de tejidos. Adicionalmente, se procesaron algunos especímenes para microscopía electrónica. Los tejidos se examinaron por microscopía de epifluorescencia o por microscopía confocal. Adicionalmente, algunos especímenes se examinaron por microscopía electrónica de transmisión.

Resultados: En los ratones examinados desde 5 minutos a 24 horas después de la inyección, eran muy abundantes liposomas marcados con CM-DiI o con DiI o complejos liposoma-DNA en los pulmones. Adicionalmente, aquéllos eran muy numerosos en las células endoteliales de los capilares alveolares. La fluorescencia en los capilares alveolares se distribuía uniformemente en todos los lóbulos de ambos pulmones. Adicionalmente, existía algo de fluorescencia de CM-DiI o DiI en los monocitos/macrófagos intravasculares.

A continuación del pulmón, el hígado y el bazo tenían la cantidad máxima de liposomas o complejos marcados. En estos órganos, la fluorescencia de CM-DiI o DiI estaba co-localizada con las cuentas fluorescentes. En el hígado, la fluorescencia de CM-DiI o DiI y las cuentas se encontraban en las células de Kupffer. En el bazo, aquéllas se encontraban en los macrófagos.

El ovario tenía también vasos sanguíneos marcados intensamente con liposomas o complejos marcados con CM-DiI o marcados con DiI. Específicamente, se observó que las células endoteliales en los vasos sanguíneos angiogénicos de folículos grandes y los cuerpos lúteos de los ovarios del ratón absorbían ávidamente DDAB:colesterol (liposomas o)-complejos de DNA marcados con CM-DiI o DiI después de inyección intravenosa. Estas observaciones se documentaron fotográficamente (Figura 1). Otros vasos sanguíneos ováricos contenían relativamente pocos complejos marcados. Estos resultados se utilizaron para deducir que las células angiogénicas endoteliales absorben preferentemente liposomas y complejos liposoma-DNA, es decir, que los liposomas catiónicos utilizados en los experimentos eran mucho más propensos a asociarse con las células endoteliales que sufrían angiogénesis en comparación con las células endoteliales correspondientes que no sufrían angiogénesis.

Los liposomas o complejos marcados eran también muy abundantes en las células endoteliales de las vénulas endoteliales altas (HEV) de los ganglios linfáticos y los parches de Peyer del intestino delgado, en tanto que eran escasos en las células endoteliales de los capilares de estos órganos linfoides. Los liposomas o complejos marcados eran también numerosos en las células endoteliales capilares de la hipófisis anterior, el miocardio, el diafragma, la corteza suprarrenal y el tejido adiposo.

Eran abundantes los liposomas o complejos marcados en los monocitos/macrófagos unidos a las vénulas de la vejiga urinaria, el útero, y el tubo de Falopio. Algunas vénulas contenían grandes números de monocitos/macrófagos marcados. Adicionalmente, estaban marcadas una pequeña proporción de las células endoteliales de arteriolas, capilares, y vénulas en estos órganos.

Un número relativamente pequeño de liposomas o complejos marcados estaban asociados con las células endoteliales capilares de la hipófisis posterior, la médula renal, los vellos intestinales (íleon), el páncreas, y la médula suprarrenal. Prácticamente no se encontró ningún liposoma o complejo marcado en las células endoteliales del cerebro, la glándula tiroides, la corteza renal, los islotes pancreáticos, la tráquea o los bronquios, con la excepción de un monocito/macrófago ocasional.

Conclusiones: La formulación de liposomas DDAB:colesterol o complejos liposoma-DNA marcados con CM-DiI o DiI utilizada en estos estudios se direccionaba a tres tipos de células principales: células endoteliales, macrófagos, y monocitos. La absorción de liposomas o complejos era específica de órganos y vasos. En la mayoría de los casos aquéllos eran absorbidos por las células endoteliales capilares del pulmón y los macrófagos del hígado y el bazo. Las células endoteliales capilares del ovario, la hipófisis anterior, el corazón, el diafragma, la corteza suprarrenal, y el tejido adiposo estaban también direccionados. Los vasos sanguíneos que absorbían liposomas o complejos en el ovario eran sitios de angiogénesis. Adicionalmente, se direccionaban HEV de los ganglios linfáticos y los parches intestinales de Peyer. El direccionamiento de las células endoteliales o macrófagos de otros órganos era menos frecuente y más variable. Los vasos sanguíneos del cerebro, tiroides, corteza renal, tráquea y bronquios no estaban direccionados.

Adicionalmente, los experimentos documentaban que los liposomas o complejos no se fugaban de la vasculatura en la mayoría de los órganos. Aunque aquéllos se encontraban en las células extravasculares del bazo, que tienen vasos sanguíneos con un endotelio discontinuo, los mismos no se extravasaban a otros órganos.

Finalmente, la absorción ávida de liposomas catiónicos y complejos liposoma-DNA por los vasos sanguíneos de los folículos ováricos grandes y los cuerpos lúteos indica que las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos eran sitios de absorción preferencial.

Ejemplo 2

Absorción de complejos DDAB:colesterol (liposoma o)-DNA en los ratones RIP-Tag5

Los resultados de los experimentos del Ejemplo 1 indicaban que los vasos sanguíneos angiogénicos en los folículos ováricos y los cuerpos lúteos absorbían ávidamente los liposomas catiónicos y los complejos liposoma-DNA. De acuerdo con ello, se realizó un experimento para determinar si las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos de los tumores absorben con avidez los liposomas catiónicos o complejos liposoma-DNA.

Se utilizó el modelo de tumor RIP-Tag5 transgénico, como se describe en la Experimental Mouse Models Section, Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315:115-22,1985; Hanahan, D., and J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996. En este modelo, designado RIP-Tag, el oncogén del virus SV-40, antígeno T grande (Tag), está activado por una región del promotor de insulina de la rata (RIP). Cuando se inserta en el genoma murino, este constructo induce la expresión del antígeno T específicamente en las células β de los islotes pancreáticos.

Un atributo importante de este modelo es que diversas etapas del desarrollo del tumor, y por consiguiente diversas etapas de la angiogénesis, están presentes simultáneamente en cada ratón RIP-Tag5. Aunque la totalidad de los 300-400 islotes expresan el antígeno T, los islotes se desarrollan inicialmente con normalidad. Sin embargo, al cabo de 6 semanas, aproximadamente la mitad son hiperplásticos, y de éstos, una pequeña proporción desarrollan tumores al cabo de 10 semanas. La tumorigénesis parece coincidir con la aparición de angiogénesis. Esta conversión ha sido designada el "cambio angiogénico", Folkman, J., K. Watson, D. Ingber, y D. Hanahan, Induction of angiogenesis during

the transition from hyper-plasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989; Hanahan, D., and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996. Un cambio angiogénico similar parece existir en otros modelos de tumorigénesis murina así como en varios tumores humanos, Hanahan, D., and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996.

Se utilizaron métodos y materiales de acuerdo con el Ejemplo 1. Específicamente, se inyectaron liposomas DDAB: colesterol marcados con CM-DiI o DiI por vía intravenosa en un ratón RIP-Tag5 portador de un tumor, y se inyectaron por vía intravenosa complejos DDAB:colesterol-DNA marcados con CM-DiI o DiI por vía intravenosa en otro ratón RIP-Tag5. La distribución de los liposomas o complejos en los vasos sanguíneos angiogénicos de los tumores de las células de los islotes pancreáticos se examinó 24 horas después de la inyección, y se comparó con la existente en los vasos de los islotes pancreáticos de ratones normales.

Resultados: se realizaron dos nuevas observaciones: (1) los liposomas o complejos eran absorbidos por las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos sin fugarse a través del endotelio, y (2) la absorción endosómica de los liposomas o complejos era mayor en las células endoteliales de los vasos sanguíneos angiogénicos que en las células endoteliales de los vasos normales de los islotes pancreáticos (la Figura 2 pertenece a un espécimen tisular).

Conclusiones: Este experimento proporcionó resultados consistentes con la absorción preferencial de los liposomas DDAB:colesterol o complejos liposoma-DNA por los vasos tumorales angiogénicos. Antes de repetir el experimento (1) se incrementó la intensidad de fluorescencia de los complejos liposoma-DNA, (2) los métodos de localización de los sitios de absorción de liposomas catiónicos y complejos liposoma-DNA en los tumores de los ratones RIP-Tag se mejoraron; y (3) se obtuvo una mayor familiaridad con la estructura y función de los vasos sanguíneos angiogénicos en los tumores de las células de los islotes pancreáticos en los ratones RIP-Tag5.

Ejemplo 3

(Ejemplo de referencia)

Absorción de los complejos DOTAP:colesterol-DNA en ratones RIP-Tag2

Propósito: La intensidad de fluorescencia de los complejos liposoma-DNA se había incrementado utilizando Rojo Texas-DHPE en lugar de DiI; el método de preparación del páncreas de los ratones RIP-Tag2 para localización de los sitios de absorción de los complejos fluorescentes liposoma catiónico-DNA se mejoró; y la estructura y función de los vasos sanguíneos angiogénicos en los tumores de las células de los islotes pancreáticos en los ratones RIP-Tag2 habían sido estudiadas. Con estas mejoras, se llevaron a cabo experimentos del tipo descrito en el Ejemplo 2 para determinar de qué modo eran absorbidos los liposomas catiónicos y los complejos lípido-DNA.

Métodos: Se prepararon liposomas catiónicos de vesículas unilaminares pequeñas DOTAP:colesterol, marcados con Rojo Texas-DHPE. Se prepararon complejos liposoma-DNA para una relación lípido total:DNA de 24:1 (nmoles/ μ g) en glucosa al 5%, utilizando 60 μ g de DNA plasmídico en 300 μ l. Los complejos (300 μ l) se inyectaron en las venas del rabo de ratones C57BL/6 transgénicos RIP1-Tag2 sin anestesiarse y ratones C57BL/6 normales sin anestesiarse.

Cuatro horas después de la inyección de los complejos, se anestesiaron los ratones por inyección intraperitoneal de Nembutal, 50 mg/kg. La vasculatura se fijó por perfusión de paraformaldehído al 1% a través de la aorta ascendente, y la superficie luminal de la vasculatura se coloreó por perfusión de lectina fluorescente verde, Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata, y D.M. McDonald, Permeability-unrelated changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271: H2547-2562, 1996. Montajes de tejidos enteros o secciones de Vibrátomo se montaron en Vectashield, y los vasos se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot o un microscopio confocal Zeiss LSM 410 equipado con un láser de kriptón-argón y tubos fotomultiplicadores optimizados. Las imágenes se registraron en película Kodak Ektachrome (ASA 400) o como archivos digitales de imagen confocal.

Resultados: el experimento demostró claramente una ávida absorción de los complejos DOTAP:colesterol-DNA marcados con Rojo Texas por las células angiogénicas endoteliales en los tumores pancreáticos de los ratones RIP1-Tag2. La absorción por los vasos tumorales excedía con mucho de la absorción de estos complejos por las células endoteliales correspondientes de los islotes pancreáticos normales (compárense las Figuras 3 y 4).

Los tumores se diferenciaban fácilmente de los tejidos adyacentes debido a la marcación intensa de sus vasos sanguíneos con los complejos fluorescentes rojos de liposomas. La geometría de la vasculatura de los tumores era variable, variando desde el patrón típico de los islotes normales a un retículo anastomosante, denso y tortuoso de vasos sinusoidales claramente mayores y compactados más densamente que en los islotes normales. En el último caso, la vasculatura se asemejaba a la de los cuerpos lúteos. La intensidad de marcación de los vasos tumorales estaba aproximadamente relacionada con el tamaño del tumor. Los tumores mayores tenían la marcación máxima.

Algunos vasos sanguíneos en tumores de tamaño pequeño a mediano tenían protrusiones achaparradas, focales, semejantes a aneurismas. Estos sitios eran particularmente claros, debido a la presencia de puntos anormalmente numerosos marcados con Rojo Texas, que se presumía eran endosomas. La marcación con Rojo Texas de estos sitios

era mayor que la de los vasos adyacentes. Parecía que estas estructuras podían ser brotes capilares. Las estructuras no se encontraban en tumores grandes que tenían una vasculatura densa y compleja, en la que los vasos estaban marcados densamente de manera uniforme.

- 5 No había evidencia alguna de extravasación de los complejos marcados con Rojo Texas en los tumores. Asimismo, no se observó complejo alguno marcado con Rojo Texas dentro de las agrupaciones de eritrocitos extravasculares en los tumores. La marcación intensa de la vasculatura tumoral se asemejaba a la de los cuerpos lúteos ováricos durante la primera etapa de su desarrollo.

10 Ejemplo 4

Absorción de liposomas catiónicos y complejos liposoma-DNA por los vasos sanguíneos angiogénicos en los tumores y la inflamación crónica

- 15 **Propósito:** Se llevaron a cabo experimentos del tipo descrito en el Ejemplo 3 para extender las observaciones a otros modelos de angiogénesis. Estos experimentos enfocaban también la cuestión de si tenía que estar presente DNA para que los liposomas catiónicos se direccionaran a los vasos sanguíneos angiogénicos. Se examinaron cuatro modelos animales de angiogénesis con respecto a si había una absorción preferencial de liposomas DOTAP:colesterol o complejos liposoma-DNA por los vasos sanguíneos angiogénicos.

20 **Modelos:** Modelo de tumor RIP1-Tag2. Se produjeron ratones transgénicos C57BL/6 y se determinó su fenotipo en el momento del nacimiento por análisis PCR. El modelo de ratón se ha descrito anteriormente.

- 25 **Modelo de tumor HPV.** Se produjeron ratones transgénicos HPV (virus del papiloma humano) y se determinó su fenotipo en el momento del nacimiento por análisis PCR. Se utilizaron como controles hermanos de camada no transgénicos. En este modelo, el oncogén del virus del papiloma humano está activado por una región del promotor de keratina 14. Cuando se inserta en el genoma murino, este constructo induce la expresión de HPV específicamente en las células epidérmicas. Todos los ratones transgénicos desarrollan displasia acompañada por angiogénesis en la piel del tórax superior y las orejas, y una pequeña proporción desarrollan tumores.

30 **Modelo de infección de *Mycoplasma pulmonis* en los ratones.** Esta infección da como resultado inflamación crónica de las vías respiratorias acompañada por angiogénesis en la mucosa de las vías respiratorias. Después de la anestesia (87 mg/kg de quetamina y 13 mg/kg de xilazina inyectadas intraperitonealmente), ratones macho y hembra de ocho semanas exentos de patógenos C3H/HeNcr o ratones C57BL/6 (ambos de Charles River) se inocularon por vía intranasal con 3×10^4 unidades formadoras de colonia de *Mycoplasma pulmonis* (cepa 5782C-UAB CT7), en un volumen de 50 μ l. Como controles se utilizaron ratones exentos de patógenos y se inocularon con caldo estéril. Los ratones infectados y de control se enjaularon por separado en condiciones de barrera. Se midieron los niveles séricos de anticuerpo para *M. pulmonis* al final del experimento (Microbiological Associates, Betesda, MD). Los ratones se

40 estudiaron 1 a 8 semanas después de la infección.

45 **Modelo de infección de *Mycoplasma pulmonis* en las ratas.** Al igual que en los ratones, esta infección causa enfermedad crónica de las vías respiratorias, una de cuyas características es la angiogénesis en la mucosa de las vías respiratorias. Después de la anestesia (40 mg/kg de quetamina y 8 mg/kg de xilazina inyectadas por vía intraperitoneal), se inocularon ratas Wistar macho de 8 semanas exentas de patógenos (de Charles River) por vía intranasal diariamente durante 3 días consecutivos con *Mycoplasma pulmonis* de la cepa 5782C4 en un volumen de 200 μ l. Como controles se utilizaron ratas exentas de patógenos inoculadas con caldo. Las ratas infectadas y de control se enjaularon por separado en condiciones de barrera. Se midieron los niveles séricos de anticuerpo para *M. pulmonis* y otros patógenos al final del experimento (Microbiological Associates, Betesda, MD).

50 **Métodos:** Se prepararon liposomas catiónicos DOTAP:colesterol, marcados con Rojo Texas-DHPE, como se describe en el Ejemplo 3. Los liposomas se inyectaron en una vena del rabo de los ratones a una dosis de 360 nmol de lípidos totales en un volumen de 100 μ l en glucosa al 5%. Las ratas se infectaron por la vía de la vena femoral. Se prepararon complejos liposoma-DNA para una relación lípido total:DNA de 24:1 en glucosa al 5%, utilizando 60 μ g de DNA plasmídico en 200-300 μ l. Los liposomas o los complejos (200-300 μ l) se inyectaron en una vena del rabo de ratones (RIP-Tag2, HPV, o infectados con *M. Pulmonis*, no anestesiados. Como controles se utilizaron ratones no transgénicos, exentos de patógenos.

60 A los 20 minutos o 4 horas después de la inyección, los ratones o ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de Nembutal, 50 mg/kg. La vasculatura se fijó por perfusión de paraformaldehído al 1% a través de la aorta ascendente, y la superficie luminal de la vasculatura se coloreó por perfusión de lectina fluorescente verde, Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata, y D.M. McDonald. Se revelaron cambios relacionados con la permeabilidad en los bordes de las células endoteliales en las vénulas inflamadas por fijación de lectina. Am.J. Physiol 271: H2547-2562, 1996. Montajes enteros de tejidos o secciones de Vibrátomo se montaron en Vectashield, y los vasos se examinaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss o microscopio confocal.

65 El grado de absorción de liposomas o complejos fluorescentes se cuantificó por microscopía confocal. Resumidamente, una serie de 12 imágenes confocales separadas por 2,5 μ m en el eje focal (z) se recogió en la región rostral de la tráquea en los canales de fluoresceína y Rojo Texas utilizando una lente 20x NA 0,6 (Zeiss) y ajustes normalizados

del tamaño del estenope confocal, la ganancia del tubo fotomultiplicador, y la potencia del láser. Se generaron proyecciones de la serie de imágenes que mostraban los vasos (fluoresceína-*L. esculentum*) y los liposomas (Rojo Texas) por separado. Utilizando el soporte lógico confocal, se definieron en las imágenes de los vasos regiones de un área aproximada de 200 μm^2 , después de lo cual se midió la fluorescencia media de las regiones correspondientes de la imagen de los liposomas. Se determinó la intensidad de fondo por medida de la fluorescencia en regiones seleccionadas adyacentes a los vasos. Las medidas se realizaron sobre 25 vasos por tráquea y 4 tráqueas por grupo (n = 4). La significación de las diferencias se evaluó por el ensayo t de Student.

Los tejidos preparados para microscopía electrónica de transmisión se procesaron como se ha descrito previamente, McDonalds, D.M. Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to inflammatory stimuli, *Am. J. Physiol.* 266: L61-L83, 1994. Resumidamente, la perfusión del fijador primario (aldehído glutárico al 3% en tampón de cacodilato 75 mM, pH 7,1, más 1% de sacarosa, 4% de PVP, 0,05% de CaCl_2 , y 0,075% de H_2O_2) durante 5 min a la temperatura ambiente fue seguida por perfusión del fijador secundario (aldehído glutárico al 3% en tampón de cacodilato 75 mM, pH 7,1, que contenía 0,05% de CaCl_2 , 1% de sacarosa, y 4% de PVP) durante 5 min. Se dejó que los tejidos se fijaran *in situ* durante 1 hora a la temperatura ambiente, después de lo cual se retiraron y se dejaron durante una noche en fijador secundario a 4°C. Los tejidos se cortaron con una cuchilla de afeitar o se dividieron en rodajas con un cortador de tejidos, después de lo cual se sometieron a fijación en osmio (OsO_4 al 2% en tampón de cacodilato 100 mM, pH 7,4, durante 18 h a 4°C), se lavaron en H_2O (18 h a 4°C), y se tiñeron en bloque con acetato de uranilo (acuoso, 37°C durante 48 horas). El tejido se deshidrató luego con acetona, se infiltró, y se incrustó en resina epoxi. Se cortaron secciones ultra-delgadas con un ultramicrotomo, se montaron sobre rejillas de especímenes de una sola ranura, y se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss EM-10.

Resultados: Los experimentos revelaron que los liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas, en ausencia de DNA, se direccionaban selectivamente a las células angiogénicas endoteliales de los tumores en los ratones RIP1-Tag2, análogamente a los descubrimientos previos con los complejos DOTAP:colesterol-DNA marcados con Rojo Texas y los complejos DDAB:colesterol-DNA marcados con DiI. Este experimento y experimentos subsiguientes sobre ratones transgénicos RIP1-Tag2 confirmaron que la absorción de los liposomas catiónicos por los vasos sanguíneos angiogénicos de los islotes hiperplásticos y tumores excedía con mucho a la de los vasos normales correspondientes (Figuras 5, 6, 7 y 8). En algunos vasos de los islotes hiperplásticos y tumores pequeños, los liposomas eran absorbidos por las células endoteliales sólo en regiones focales (Figura 8), mientras que en los tumores mayores la absorción era más generalizada (Figura 6). Se pensó que las regiones focales de absorción eran sitios posibles de crecimiento de nuevos vasos (Figura 8).

Dado que esta propiedad de los liposomas catiónicos o complejos liposoma-DNA, tenía el uso práctico potencial de suministrar selectivamente sustancias a las células angiogénicas endoteliales, parecía deseable determinar si esta propiedad de las células angiogénicas endoteliales en los tumores era compartida por las células endoteliales en otros sitios de angiogénesis patológica. Esta cuestión se abordó en experimentos en los cuales se examinó la absorción de los liposomas DOTAP:colesterol marcados con Rojo Texas por las células angiogénicas endoteliales en la tráquea de ratones con infección de *Mycoplasma pulmonis*, que causa inflamación crónica de las vías respiratorias, una de cuyas características es la angiogénesis (compárense las Figuras 9 y 10). Se encontró que las células angiogénicas endoteliales en las regiones de inflamación crónica eran sitios de absorción anormalmente alta de liposomas catiónicos (Figura 10). Específicamente, los vasos en las tráqueas de los ratones infectados con *M. pulmonis* tenían un grado de absorción anormalmente alto. Las medidas por microscopía confocal de los vasos sanguíneos angiogénicos demostraron que los ratones infectados tenían una absorción 20 a 30 veces mayor que los controles (Figura 11). Algunos vasos angiogénicos tenían una absorción 100 veces mayor. Los estudios por microscopía confocal y electrónica de las células angiogénicas endoteliales en ratones infectados con *M. pulmonis* sugerían que los liposomas catiónicos se asociaban primeramente con los endosomas (Figura 12) y posteriormente se internalizaban en los mismos (Figuras 13).

Análogamente, los liposomas catiónicos eran absorbidos ávidamente por los vasos sanguíneos angiogénicos en los folículos ováricos y los cuerpos lúteos de los ratones, la piel displásica de los ratones transgénicos HPV, y las tráqueas de ratas con angiogénesis debida a infección de *M. pulmonis*.

Conclusiones: Estos experimentos confirmaron que los liposomas catiónicos y los complejos liposoma-DNA están direccionados preferentemente a las células angiogénicas endoteliales de los tumores y los sitios de inflamación crónica.

Los documentos siguientes se citan por letras y números a todo lo largo del texto anterior.

A. U.S. Pat. No. 4,897,355

B. U.S. Pat. No. 4,394,448

C. U.S. Pat. No. 5,328,470

D. WO93/12240

E. WO/91/06309

- F. **Huang**, *et al*, *Cancer Res.* 52, 5135 (1992).
- G. **Rosenecker** *et al.*, *PNAS* 93, 7236 (1996).
- 5 H. **Abdi**, *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31, 310 (1995).
- I. **Chonn** *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 698 (1995).
- J. **Green**, *et al.*, *Adv. Exp. Med. Bio.* 383, 83 (1995).
- 10 K. **Hung**, *et al*, *Gene* 159, 65 (1995).
- L. **Ledley**, *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 6, 1129 (1995).
- 15 M. **Mori**, *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 35, 447 (1995).
- N. **Volm**, *et al.*, *et al*, *Curr. Opin. Oncol.* 7, 429 (1995).
- O. **Litzinger**, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 99 (1994).
- 20 P. **Northfelt**, *et al.*, *Drugs* 48, 569 (1994).
- Q. **Oku**, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 11, 231 (1994).
- 25 R. **Gabizon**, *et al.*, *Ann Biol. Clin (Paris)* 51, 811 (1993).
- S. **Huang**, *et al*, *Am. J. Pathol.* 143, 10 (1994).
- T. **Mori**, *et al.*, *Pharm. Res.* 10, 507 (1993).
- 30 U. **Priebe**, *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 60, 215 (1993).
- V. **Straubinger**, *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 69 (1993).
- 35 W. **Fidler**, *et al.*, *World J. Surg.* 16, 270 (1992).
- X. **Rowlinson-Busza**, *et al.*, *Curr. Opin. Oncol.* 4, 1142 (1992).
- Y. **Sugarman**, *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12, 231 (1992).
- 40 Z. **Pak**, *et al.*, *Biotherapy* 3, 55 (1991).
- AA. De **Smidt**, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7, 99 (1990).
- 45 BB. **Papahadjopoulos**, *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 343, 85 (1990).
- CC. **Shibata**, *et al.*, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 30, 242 (1990).
- DD. **Hughes**, *et al.*, *Cancer Res.* 49, 6214 (1989).
- 50 EE. **Shibata**, *et al.*, *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 29, 696 (1989).
- FF. **Freeman**, *et al.*, *Cancer* 58, 573 (1986).
- 55 GG. **Zolotareva**, *et al.*, *Eksp. Onkol.* 8, 28 (1986).
- HH. **Caride**, *et al*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1, 121 (1985).
- II. **Yatvin**, *et al.*, *Med. Phys.* 9, 149 (1982).
- 60 JJ. **Liposomes**, A Practical Approach, edited by Nev, R.R.C., *IRL Press*, 1994.
- KK. **Liposomes**, From Physics to Applications, Lasic, D.D., *Elsevier*, 1993.
- 65 LL. **Thurston**, *et al.*, "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice", *J. Clin. Invest.*, April 1, 1998.

1. **Arfors, K.-E., G. Rutili, and E. Svensjö.** Microvascular transport of macromolecules in normal and inflammatory conditions. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 463: 93-103, 1979.
2. **Baluk, P., and D. M. McDonald.** The b2-adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvascular leakage by inhibiting endothelial gap formation. *Am. J. Physiol.* 266: L461-L468, 1994.
3. **Bowden, J. J., A. Garland, P. Baluk, P. Lefevre, E. Grady, S. R. Vigna, N. W. Bunnett, and D. M. McDonald.** Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8964-8968, 1994.
4. **Brigham K., B. Meyrick, B. Christman, M. Magnuson, G. King, and L. C. Berry.** *In vivo* transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am. J. Med. Sci.* 298: 278-281, 1989.
5. **Christenson, L. K., and R. L. Stouffer.** Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate *corpus luteum* during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology* 137: 367-374, 1996.
6. **Conary, J. T., R. E. Parker, B. W. Christman, R. D. Faulks, G. A. King, B. O. Meyrick, and K. L. Brigham.** Protection of rabbit lungs from endotoxin injury by *in vivo* hyperexpression of the prostaglandin G/H synthase gene. *J. Clin. Invest.* 93: 1834-1840, 1994.
7. **Folkman, J., K. Watson, D. Ingber, and D. Hanahan.** Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989.
8. **Hanahan, D.** Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315: 115-22, 1985.
9. **Hanahan, D., and J. Folkman.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996.
10. **Lundberg, J. M., and A. Saria.** Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature* 302: 251-253, 1983.
11. **Majno, G., and G. E. Palade.** Studies on inflammation. I. The effect of histamina and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11:571-604, 1961.
12. **McDonald, D. M.** Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes, and epithelial cells. *J. Neurocytology* 17:583-603, 1988.
13. **McDonald, D. M.** The ultrastructure and permeability of tracheobronchial blood vessels in health and disease. *Eur. J. Respir. Dis.* 3 (Suppl 12):572s-585s, 1990.
14. **McDonald, D. M.** Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am. J. Physiol.* 266: L61-L83, 1994.
15. **McDonald, D. M., and A. Goldfein.** The relation of lutein cell Golgi apparatus morphology to ovarian progesterone secretion during the rat estrous cycle. *Anat. Rec.* 151: 385, 1965.
16. **McDonald, D. M., K. Seiki M. Prizant, and A. Goldfein.** Ovarian progesterone secretion in relation to the lutein cell Golgi apparatus during rat estrous cycle. *Endocrinology* 85: 236-243, 1969.
17. **Nabel, E. G., D. Gordon, Z. Y. Yang, L. Xu, H. San, G. E. Plautz, B. Y. Wu, X. Gao, L. Huang, and G. J. Nabel.** Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum. Gene Ther.* 3: 649-56, 1992.
18. **Philip, R., D. Liggitt, M. Philip, P. Dazin, and R. J. Debs.** *In vivo* gene delivery: Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J. Biol. Chem.* 268: 16087, 1993.
19. **Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata, and D. M. McDonald.** Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271: 112547-2562, 1996.
20. **Tsukada, K., T. Matsushima, and N. Yamanaka.** Neovascularization of the *corpus luteum* of rats during the estrus cycle. *Pathol Int* 46:408-416, 1996.
21. **Umeno, E., J. A. Nadel, and D. M. McDonald.** Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. *J. Appl. Physiol.* 69: 2131-2136, 1990.
22. **Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu, and R. Debs.** Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261: 209-211, 1993.

23. **Bowden, J. J., T. R. Schoeb, J. R. Lindsey, and D. M. McDonald.** Dexamethasone and oxytetracycline reverse the potentiation of neurogenic inflammation in airways of rats with *Mycoplasma pulmonis* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 150:1391-401, 1994.

5 24. **McDonald, D. M.** Infections intensify neurogenic plasma extravasation in the airway mucosa. *Am Rev Respir Dis* 146: S40-4, 1992.

25. **McDonald, D. M.** Upregulation of tachykinin receptors in an animal model of chronic airway inflammation. *Pulmonary Pharmacology* 8: 203-205, 1995.

10 26. **McDonald, D. M., T. R. Schoeb, and J. R. Lindsey.** *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. *J Clin Invest* 87:787-99, 1991.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma catiónico, que comprende:

al menos 5% molar de al menos un lípido catiónico y opcionalmente lípidos neutros y un compuesto tóxico que destruye una célula angiogénica endotelial de un tumor, **caracterizado** por tener un potencial zeta mayor que 0 mV cuando está presente al pH fisiológico.

2. El liposoma de la reivindicación 1, en el cual dicho lípido catiónico comprende una cadena principal y más de un ácido graso de 12 a 24 carbonos de longitud y que contiene hasta seis insaturaciones enlazadas a la cadena principal por enlaces acilo o éter.

3. El liposoma de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que tiene una selectividad al menos cinco veces mayor entre las células endoteliales angiogénicas y las células endoteliales normales correspondientes.

4. El uso de un liposoma catiónico que comprende al menos 5% molar de al menos un lípido catiónico y opcionalmente al menos un lípido neutro y una sustancia que afecta a las células angiogénicas endoteliales seleccionada de un compuesto tóxico que destruye una célula angiogénica endotelial de un tumor que tiene un potencial zeta mayor que 0 mV cuando está presente al pH fisiológico, para la fabricación de una composición farmacéutica para tratamiento del cáncer.

5. El uso de la reivindicación 4, en el cual dicho lípido catiónico comprende una cadena principal y más de un ácido graso que tiene 12-24 carbonos de longitud y que contiene hasta seis insaturaciones enlazadas a la cadena principal por enlaces acilo o éter.

6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el cual dicho liposoma se administra por inyección intravascular.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el cual dicho liposoma tiene una selectividad al menos cinco veces mayor entre las células angiogénicas endoteliales y las células endoteliales normales correspondientes.

8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el cual dicho paciente es un mamífero, particularmente un humano.

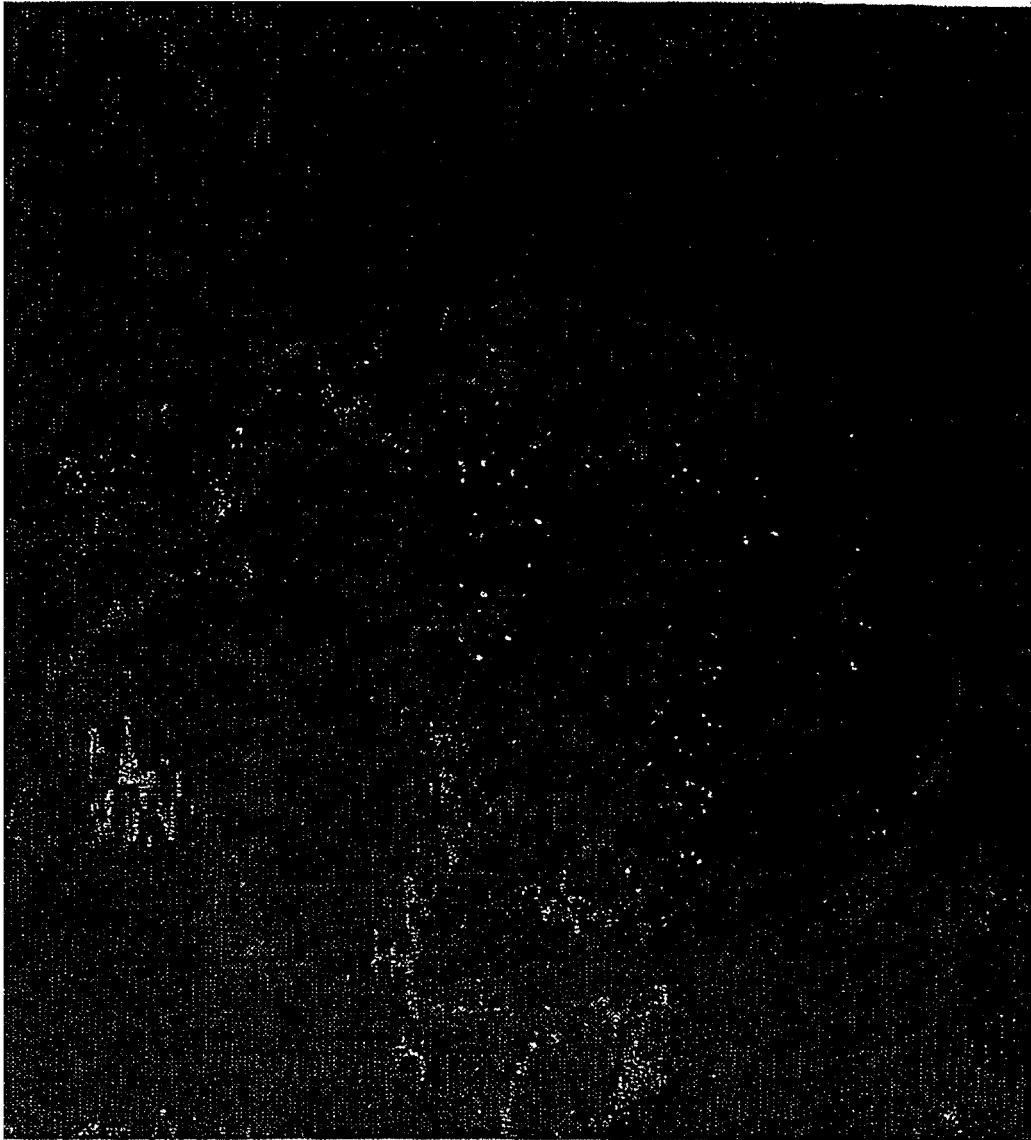


Figura 1



Figura 2

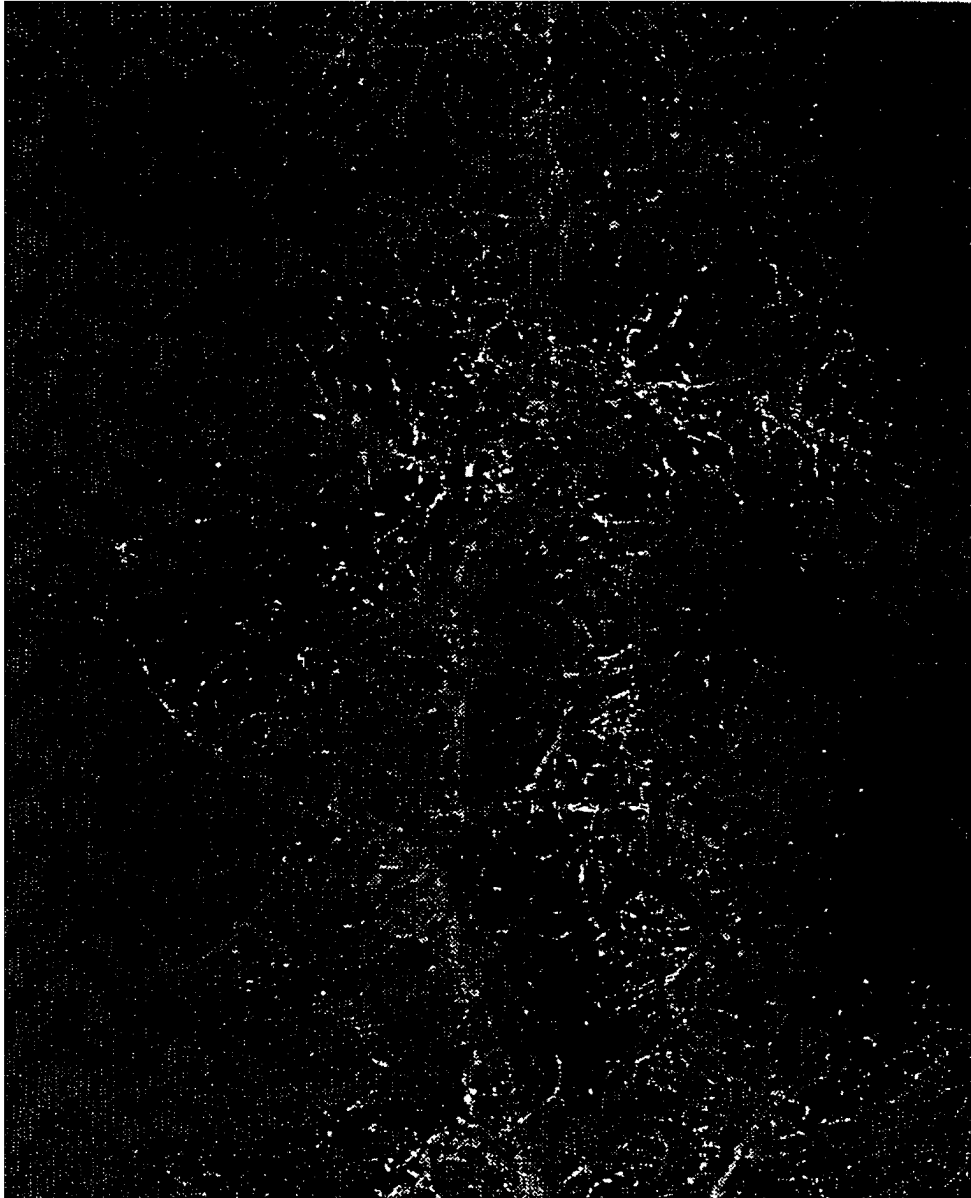


Figura 3



Figura 4

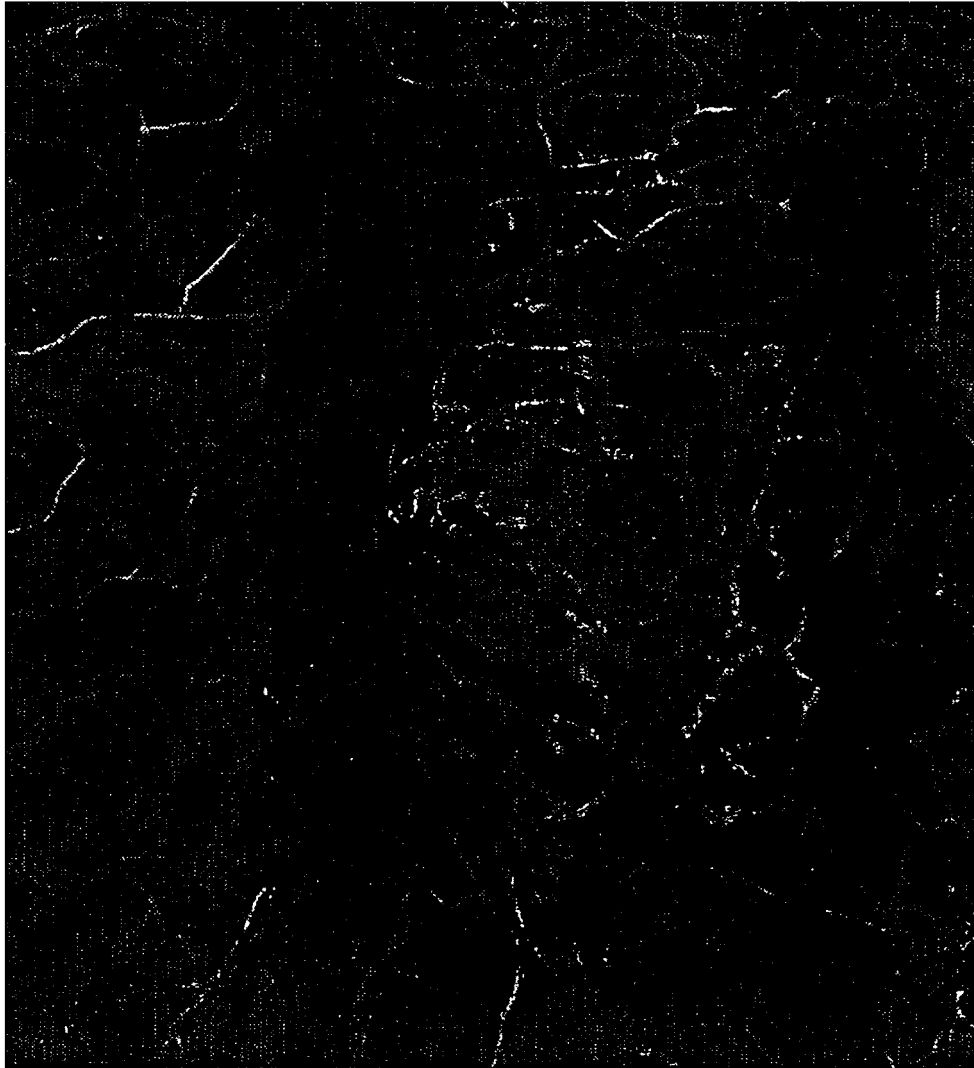


Figura 5

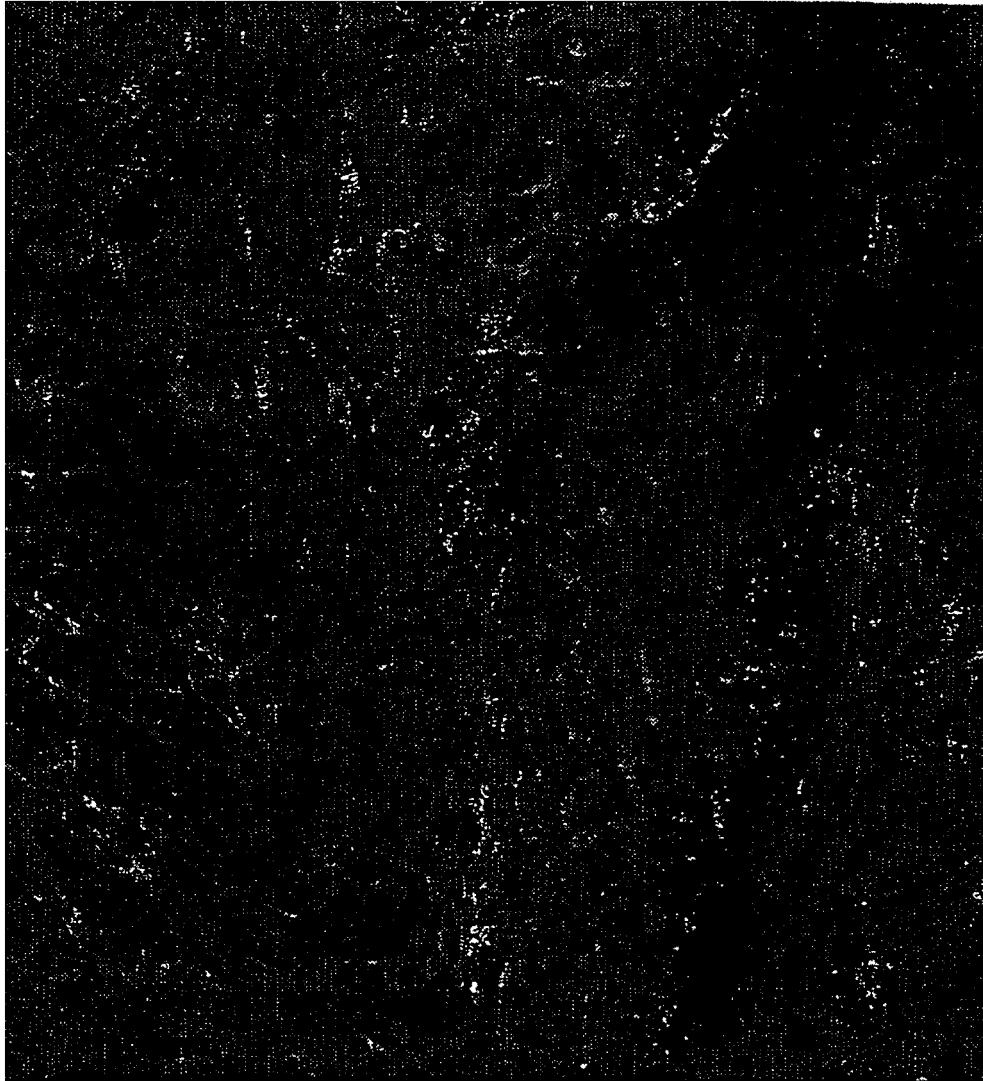


Figura 6

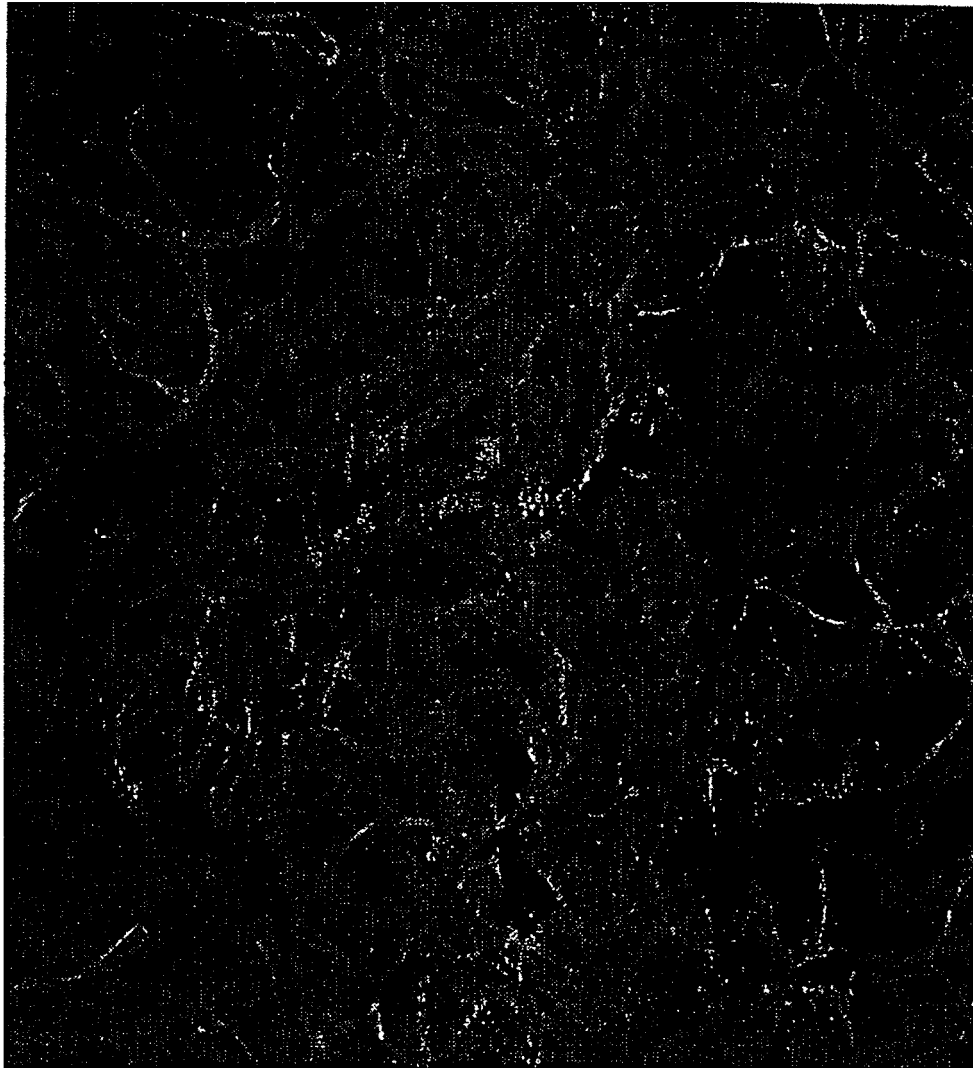


Figura 7

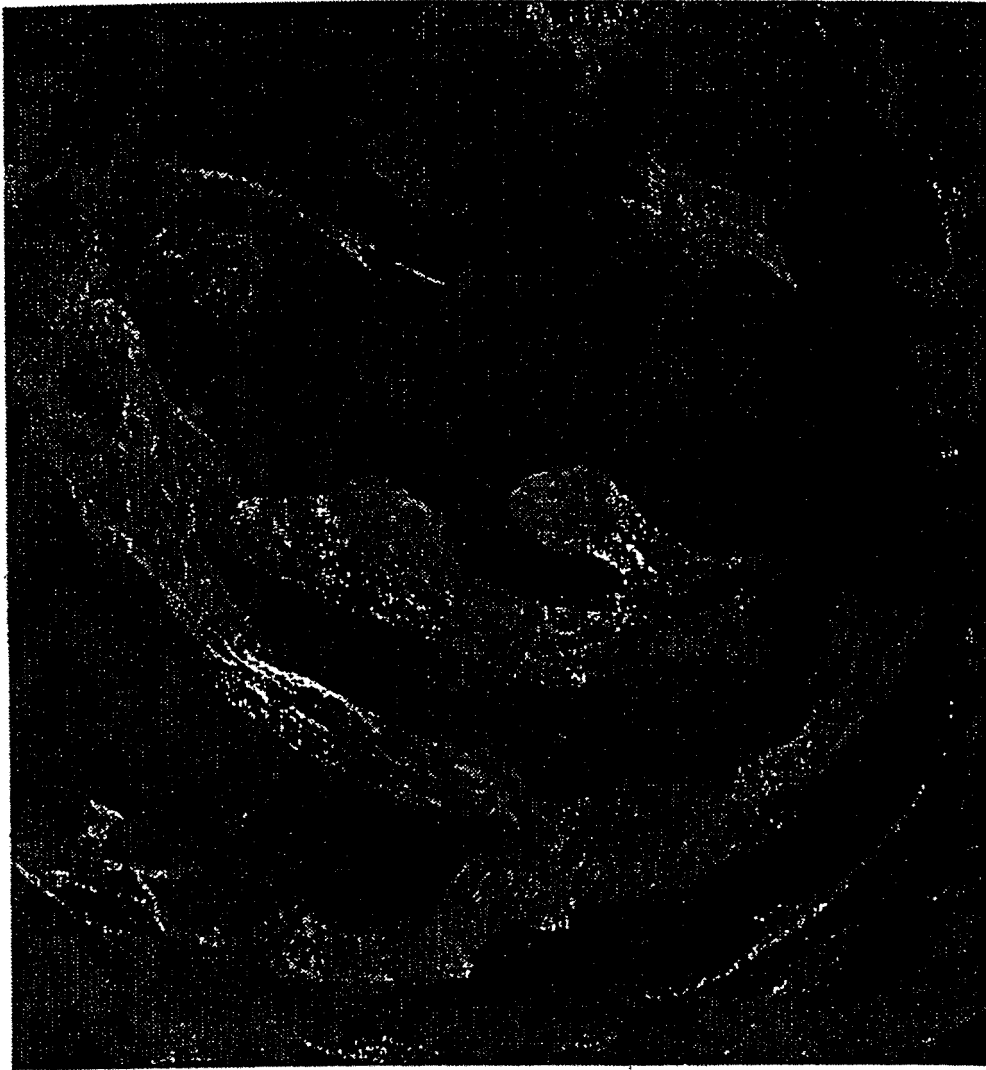


Figura 8

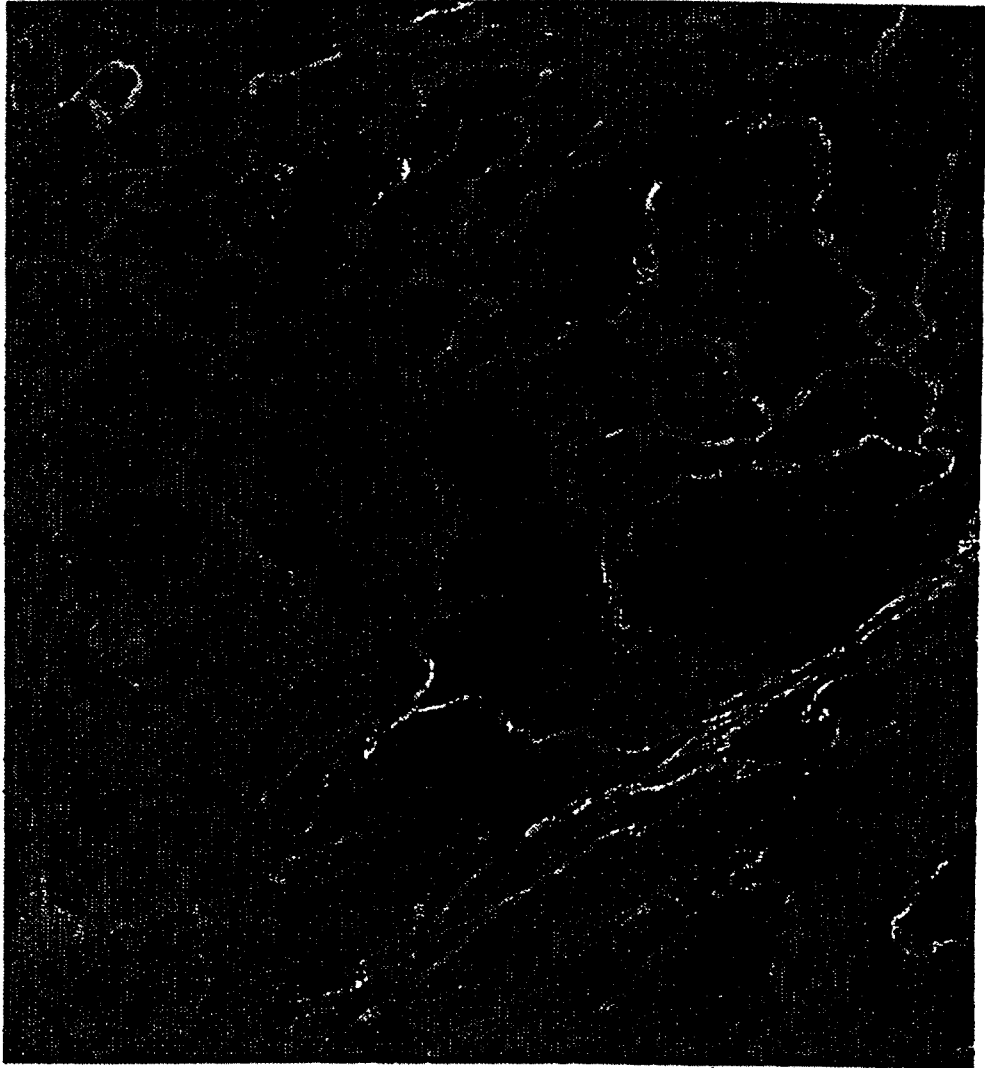


Figura 9

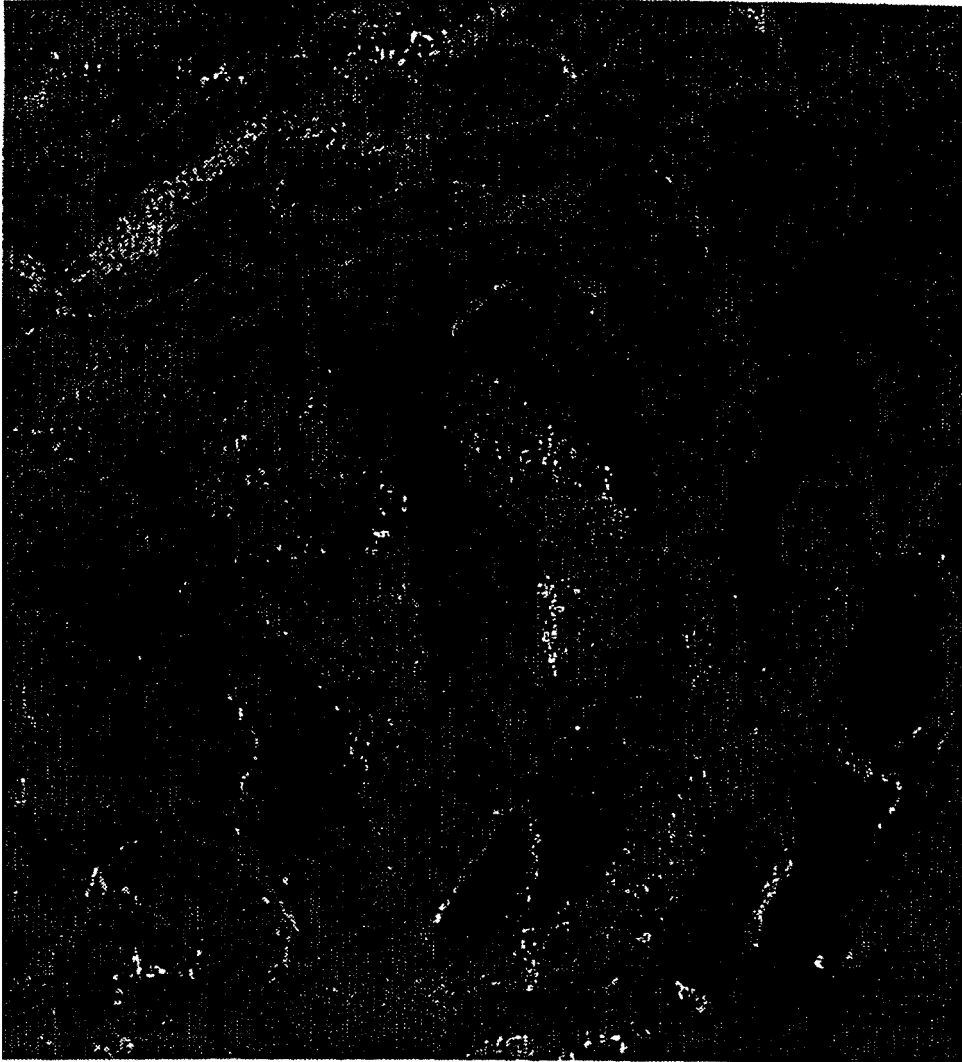


Figura 10

Absorción de los liposomas DOTAP:colesterol por
las células endoteliales de los vasos sanguíneos
traqueales en los ratones C3H/HeNCr

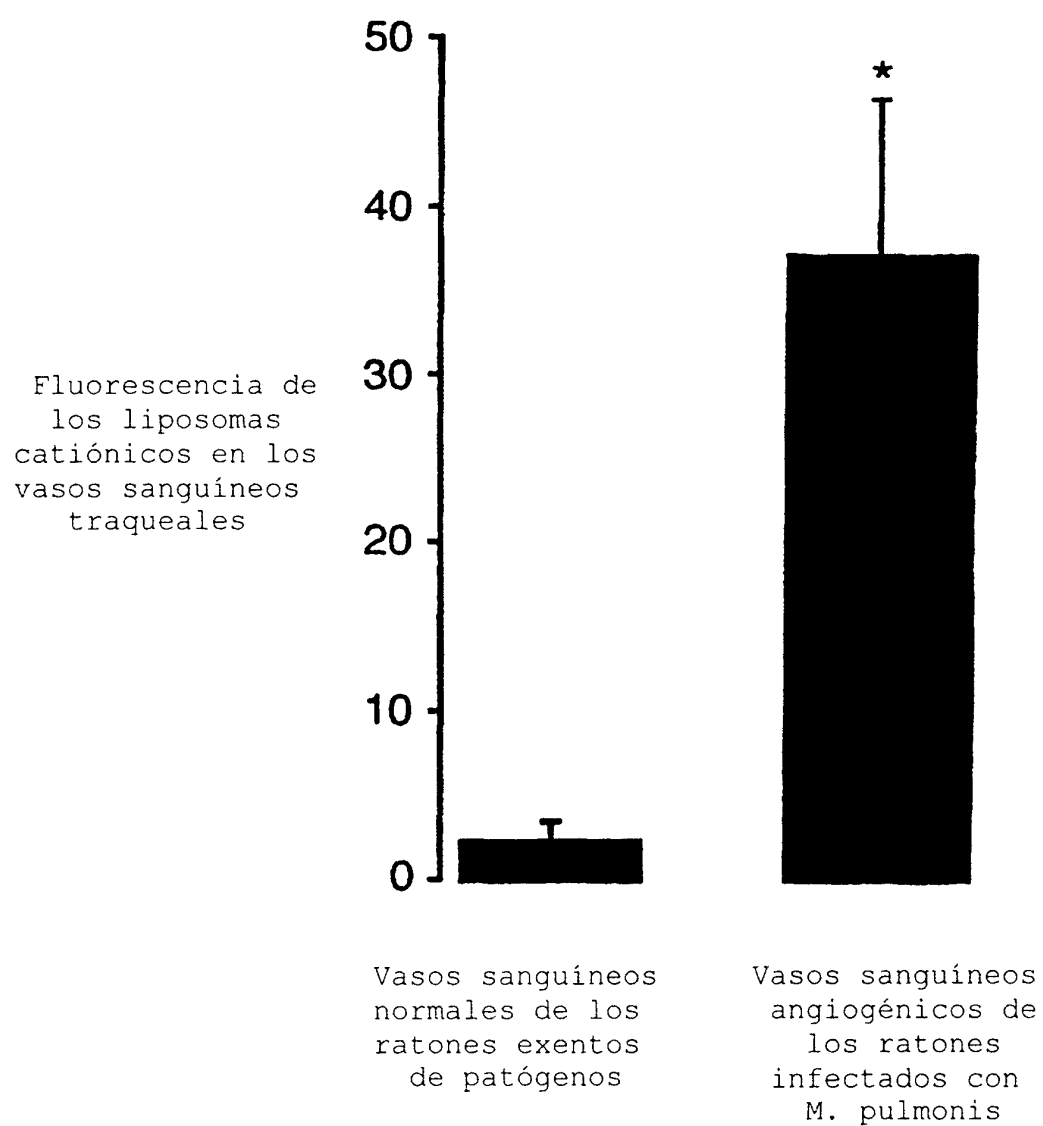


Figura 11

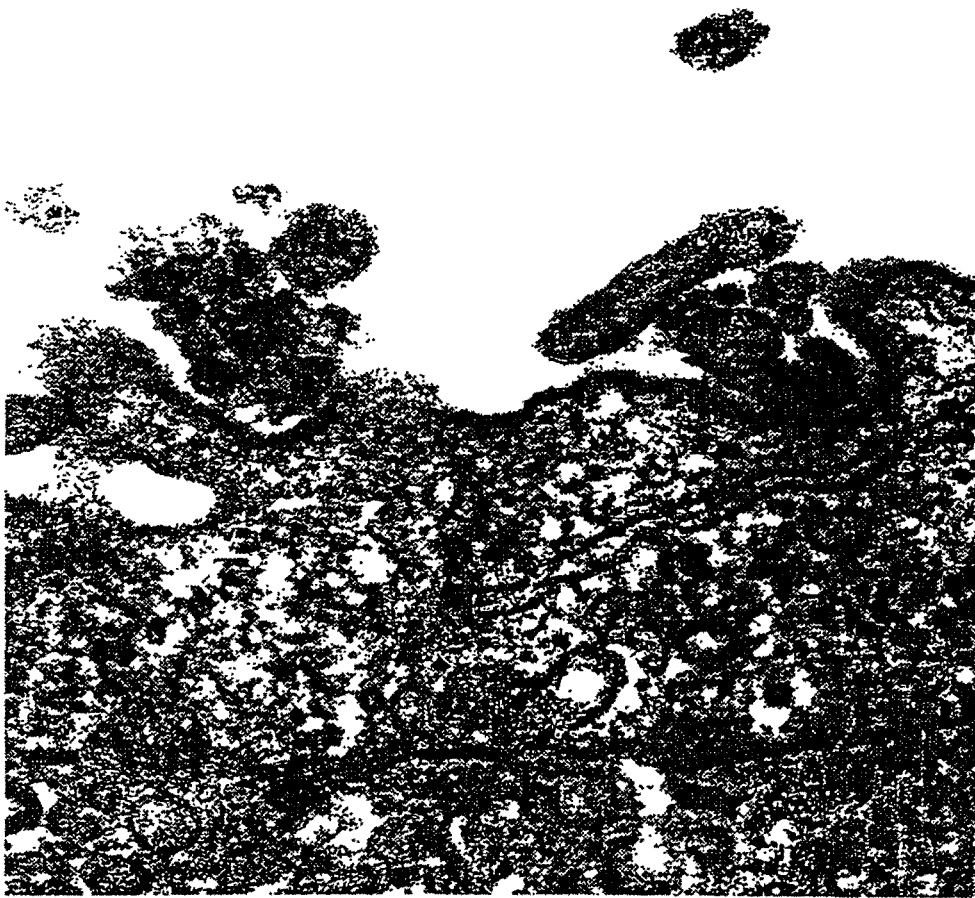


Figura 12



Figura 13