

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 823**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2014 PCT/IB2014/061907**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2014 E 14808354 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3003275**

54 Título: **Liposomas para modulación de proteína de síndrome de Wiskott-Aldrich**

30 Prioridad:

03.06.2013 US 201361830178 P

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

15.12.2021

73 Titular/es:

**BAR-ILAN UNIVERSITY (100.0%)
5290002 Ramat Gan, IL**

72 Inventor/es:

BARDA-SAAD, MIRA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 885 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liposomas para modulación de proteína de síndrome de Wiskott-Aldrich

Solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio según el 35 U.S.C. 119(e) de la Solicitud Provisional de EE. UU. 61/830,178 presentada el 3 de junio de 2013.

Campo técnico

Las realizaciones de la invención se refieren a liposomas y procedimientos de tratamiento de enfermedades por medio de su uso.

10 Antecedentes

- 15 La proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASp) es una proteína que se expresa en células hematopoyéticas, las células responsables de la formación de componentes sanguíneos. Las proteínas de la familia WASp son proteínas citoesqueléticas que están involucradas en la polimerización de actina, un procedimiento que es responsable de la proliferación celular, la motilidad, la invasión y la metástasis. WASp es un miembro constitutivo de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) que comparten una estructura de dominio similar y que están involucradas en la polimerización de actina.

- 20 De manera adicional a WASp, una proteína humana que se conoce como proteína de interacción con WASp (WIP) se expresa también en células hematopoyéticas. WIP se une a WASp y está involucrada en la polimerización de actina. Las mutaciones o las eliminaciones del gen del síndrome de Wiskott-Aldrich que conducen a niveles de expresión más bajos de la proteína WASp correctamente funcional pueden conducir al síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). El WAS es una enfermedad hereditaria rara, que prevalece de manera principal en el sexo masculino, en la que los pacientes pueden padecer de un sistema inmunológico comprometido, eccema, autoinmunidad y neoplasias malignas.

- 25 Otro trastorno genético menos grave que se relaciona con WASp y que presenta síntomas similares a WAS consiste en trombocitopenia ligada a X (XLT) que se caracteriza por recuentos bajos de plaquetas, diarrea y sangrado incontrolable. Actualmente, los tratamientos para WAS y XLT se enfocan en el tratamiento de los síntomas de las enfermedades en lugar de la modificación de la expresión y la función de WASp.

Sumario

- 30 Los inventores han descubierto que WASp y WIP se sobreexpresan en neoplasias malignas hematopoyéticas que se relacionan con células hematopoyéticas mutadas. Las células hematopoyéticas, en particular, los linfocitos, en las que se detectó una sobreexpresión de WASp, mostraron un aumento de la migración celular, la invasividad celular y la degradación de la matriz extracelular (ECM) en comparación con los linfocitos normales en los que WASp no se sobreexpresó.

- 35 En neoplasias malignas que se relacionan con células hematopoyéticas, tales como leucemia linfocítica aguda del precursor B o el precursor T (ALL), linfoma no Hodgkin (NHL) y leucemia linfocítica crónica (LLC), las células malignas tienden a formar estructuras de membrana tales como invadopodios para la invasión celular, la migración celular y la proliferación celular, permitiendo así que la neoplasia maligna se disemine y haga metástasis en varios órganos. La metástasis que se relaciona con neoplasias malignas hematopoyéticas es un indicador de un mal pronóstico, lo que puede conducir, de manera potencial, a un desenlace letal de la enfermedad.

- 40 En un aspecto de una realización de la invención, se proporciona un procedimiento de dirección a linfocitos que sobreexpresan WASp en pacientes que padecen neoplasias malignas que se relacionan con células hematopoyéticas. Los linfocitos que sobreexpresan WASp se pueden convertir en diana mediante la administración a un paciente que así lo necesita de un liposoma que se dirige a una célula hematopoyética, en adelante denominado un "liposoma dirigido a células hematopoyéticas (HTL)", que comprende un anticuerpo que se dirige a una molécula que se expresa de manera preferente o única en linfocitos activados. En una realización de la invención, la molécula es un dominio extracelular de una molécula de adhesión celular (CAM). La CAM puede ser una integrina. La integrina puede presentar una conformación de alta afinidad con respecto al antígeno 1 relacionado con la función linfocitaria (LFA-1). El anticuerpo se puede presentar en la superficie externa del HTL. El anticuerpo puede ser, de manera opcional, una porción de anticuerpo que comprende una región de unión al antígeno, por ejemplo un fragmento Fab.

- 50 El HTL puede comprender, además, un oligonucleótido que puede reducir la expresión del gen de WASp. El oligonucleótido se puede presentar en la cavidad interna del HTL. El HTL se puede administrar a un paciente que padece una neoplasia maligna hematopoyética. El HTL puede ser atraído y fusionarse con una célula maligna hematopoyética, introduciendo así un oligonucleótido que puede reducir la expresión del gen WASp en la célula, reduciendo así la malignidad de la célula maligna hematopoyética, tratando así la neoplasia maligna hematopoyética.

- 55 El HTL puede comprender un agente (en adelante, denominado un agente de degradación de WASp) que aumenta la degradación de WASp. El agente de degradación de WASp puede ser una molécula, tal como una molécula pequeña,

un péptido o un oligonucleótido. El agente de degradación de WASp se puede presentar en la cavidad interna del HTL. El HTL se puede administrar a un paciente que padece una neoplasia maligna que se relaciona con una célula hematopoyética. El HTL puede ser atraído y fusionarse con una célula maligna hematopoyética, introduciendo así un agente de degradación de WASp en la célula, aumentando la degradación de WASp, reduciendo así la malignidad de la célula maligna hematopoyética, tratando así la neoplasia maligna hematopoyética.

De acuerdo con una realización de la invención, los inventores sugieren además la dirección a células mediante el uso de un liposoma para tratamiento de WAS y/o XLT. Las células que presentan una expresión inadecuada de WASp o una expresión de WASp insuficiente se pueden convertir en diana mediante la administración a un paciente que así lo necesita de un liposoma, en adelante, conocido como un liposoma dirigido a células WAS o WTL. La WTL puede comprender una fracción dirigida, tal como un anticuerpo dirigido a una célula que presenta expresión de WASp inadecuada o insuficiente. El anticuerpo se puede presentar en la superficie externa de la WTL. La WTL puede comprender, además, un agente que evita la degradación de WASp, que puede ser una molécula, tal como una molécula pequeña, un oligonucleótido o un péptido que puede evitar o reducir la degradación de WASp. El agente que evita la degradación de WASp se puede presentar en la cavidad interna de la WTL. De acuerdo con una realización de la invención, el agente que evita la degradación de WASp para WASp se encuentra en un sitio de degradación de WASp.

De acuerdo con una realización de la invención, la célula que presenta una expresión inadecuada de WASp es un leucocito u otra célula hematopoyética. De acuerdo con una realización de la invención, la célula que presenta una expresión inadecuada o insuficiente de WASp es un linfocito, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, un granulocito, un megacariocito o una plaqueta.

El anticuerpo presente en la WTL se puede dirigir a una molécula que se expresa de manera preferente o única en un leucocito, una célula hematopoyética, un linfocito, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, un granulocito, un megacariocito o una plaqueta. El anticuerpo se puede dirigir al dominio extracelular de una molécula de superficie o una CAM. La CAM puede ser una integrina. El anticuerpo se puede dirigir a una molécula de superficie o una integrina en su conformación de actividad baja. En una realización de la invención, el anticuerpo se dirige a CD11c, CD123, CD56, CD34, CD14, CD33, CD66b, CD41, CD45, CD61, CD20, CD19, CD3, CD4, CD8, CD62 o una integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Durante el análisis, a menos que se indique lo contrario, se debe comprender que los adjetivos tales como “de manera sustancial” y “sobre” que modifican una condición o una relación característica de un rasgo o rasgos de una realización de la invención, se refieren a que la condición o la característica se define dentro de las tolerancias que son aceptables para la puesta en práctica de la realización para una aplicación para la que está prevista. A menos que se indique lo contrario, se considera que la palabra “o” en la memoria descriptiva y las reivindicaciones es la “o” inclusiva, en lugar de la “o” exclusiva, e indica al menos uno o cualquier combinación de los elementos que une.

Breve descripción de las figuras

Los ejemplos no limitantes de las realizaciones de la invención se describen a continuación con referencia a las figuras adjuntas a la presente memoria que se enumeran a continuación de este párrafo. Las estructuras, los elementos o las partes idénticas que aparecen en más de una figura se etiquetan, de manera general, con un mismo número en todas las figuras en las que aparecen. Las dimensiones de los componentes y las características que se muestran en las figuras se eligen por conveniencia y claridad de presentación y no se muestran necesariamente a escala.

La Figura 1 representa un liposoma de manera esquemática de acuerdo con una realización de la invención; y

La Figura 2 muestra un gráfico de barras que muestra la expresión relativa de WASp tras la administración de ARNip de acuerdo con realizaciones de la invención.

Descripción detallada

Como se mencionó en el sumario anterior, HTL y WTL son liposomas modificados para dirigirse a células y para tratar una enfermedad. De manera esquemática, la Figura 1 muestra un liposoma 10 de acuerdo con una realización de la invención. Los liposomas son vesículas esféricas de manera sustancial que comprenden una bicapa 20 lipídica. El liposoma 10 comprende, además, un agente 30 terapéutico, un enlazador 40 y una molécula 50 dirigida.

De acuerdo con una realización de la invención, la bicapa 20 lipídica comprende un fosfolípido, preferentemente, un fosfolípido neutro. De acuerdo con una realización de la invención, el fosfolípido es fosfatidilcolina. De acuerdo con una realización de la invención, el fosfolípido es fosfatidilcolina de soja. De acuerdo con una realización de la invención, el fosfolípido es 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE).

Otros fosfolípidos neutros que se pueden utilizar se seleccionan del grupo que consiste en:

1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC);

1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE);

1,2-dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE);

1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC); y

1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

5 De acuerdo con una realización de la invención, la bicapa lipídica comprende una mezcla de más de un lípido. De acuerdo con una realización de la invención, la bicapa lipídica comprende un esteroles, preferentemente colesterol. De acuerdo con una realización de la invención, la bicapa lipídica está compuesta por fosfatidilcolina, DPPE y colesterol. De acuerdo con una realización de la invención, la tasa entre fosfatidilcolina, DPPE y colesterol es 6:2:2. De acuerdo con una realización de la invención, el liposoma 10 es una vesícula unilaminar.

10 De acuerdo con una realización de la invención, los liposomas 10 presentan un diámetro promedio de entre aproximadamente 80 nanómetros y 200 nanómetros (nm). De acuerdo con una realización de la invención, los liposomas de HTL y WTL presentan un diámetro promedio de entre aproximadamente 90 nm y aproximadamente 140 nm, sin encontrarse ligados a una fracción dirigida. De acuerdo con una realización de la invención, los liposomas de HTL y WTL presentan un diámetro promedio de entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 170 nm después de haberse ligado a una fracción dirigida.

15 El agente 30 terapéutico puede ser una molécula, tal como una molécula pequeña, un péptido, una proteína o un oligonucleótido. El agente terapéutico 30 se puede derivar de péptidos, proteínas o nucleótidos de origen natural, o puede ser sintético. El agente 30 terapéutico puede ser un péptido que comprende aminoácidos de origen natural o no o combinaciones de estos.

20 De acuerdo con una realización de la invención en la que el liposoma 10 es un HTL, el agente 30 terapéutico puede ser un oligonucleótido que reduce la expresión de WASp. El oligonucleótido puede ser un ARN interferente pequeño (ARNip) que disminuye la expresión de WASp. De manera adicional o alternativa, un agente 30 terapéutico puede un ARN horquillado corto (ARNhc) que se inserta en un vector plasmídico o microARN (ARNmi). De acuerdo con una realización de la invención, el ARNip comprende un oligonucleótido que presenta al menos un 90% de similitud con respecto a una secuencia de la Tabla 1:

25

Tabla 1: oligonucleótidos de ARNip

SEQ. ID. NO.	Secuencia	Secuencia complementaria
1	5'-UGACUGAGUGGCUGAGUUA	3'- ACUGACUCACCGACUCAAU
2	5'-GACCUAGCCCAGCUGAUAA	3'- CUGGAUCGGGUCGACUAUU
3	5'-GAAUGGAUUUGACGUGAAC	3'- CUUACCUAAACUGCACUUG
4	5'-GCCGAGACCUCUAAACUUA	3'- CGGCUCUGGAGAUUUGAAU
5	5'-UGAGAUGCUUGGACGAAAA	3'- ACUCUACGAACCUGCUUUU
6	5'-GAAUCAGAGGCAAAGUGGA	3'- CUUAGUCUCCGUUUCACCU
7	5'-UCUCAGUUCUCUUCACUCA	3'- AGAGUCAAGAGAAGUGAGU

30 De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 1 y su secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 2 y su secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 3 y su

secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 4 y su secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 5 y su secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 6 y su secuencia complementaria. De acuerdo con una realización de la invención, el oligonucleótido puede ser ARNip que comprende un dúplex de SEQ ID NO. 7 y su secuencia complementaria.

Como se mencionó anteriormente, WASp y WIP se expresan en células hematopoyéticas y son proteínas citoesqueléticas que están involucradas en la polimerización de actina. En células que funcionan de manera normal, WASp se degrada por ubiquitilación en residuos de lisina 76 y 81, lo que conduce a la degradación de WASp. WIP se une a WASp, protegiéndola de la ubiquitilación, protegiéndola así de la degradación. En pacientes con WAS, debido a la producción de WASp mutada, WIP no se asocia con WASp de manera adecuada y, como resultado, la degradación de WASp ocurre a un ritmo más rápido en comparación con los individuos en los que WASp se expresa de manera correcta.

De acuerdo con una realización de la invención en la que el liposoma 10 es un WTL, el agente 30 terapéutico puede ser un péptido agente que se une a WASp, evitando o reduciendo su degradación. De acuerdo con una realización de la invención, el agente es una molécula, tal como una molécula pequeña, un oligonucleótido o un péptido. El agente se une a WASp, evitando la ubiquitilación en el residuo 76 de lisina o el residuo 81 de lisina.

De acuerdo con una realización de la invención, el péptido se une a WASp para evitar la proteólisis de WASp mediante la proteasa con cisteína calpaína. WASp presenta siete sitios potenciales sensibles a la proteasa con cisteína calpaína, cuatro de los cuales se ubican en el dominio N-terminal WH1 de WASp.

De acuerdo con una realización de la invención, aproximadamente 1000 a 10.000 moléculas de oligonucleótidos se presentan como agente 30 terapéutico en cada liposoma 10. De acuerdo con una realización de la invención, aproximadamente 3400 a 5200 moléculas de oligonucleótidos se presentan como agente 30 terapéutico en cada liposoma 10.

El enlazador 40 se puede conectar a la bicapa 20 lipídica y a la molécula 50 dirigida. El enlazador 40 puede comprender polietilenglicol. El enlazador 40 puede comprender un glicosaminoglicano. El glicosaminoglicano puede ser hialuronano. El hialuronano puede presentar un peso molecular de aproximadamente 700 kilodaltons (kDa) o más. La tasa entre el glicosaminoglicano y la bicapa lipídica puede ser aproximadamente 1:1 en volumen. Los glicosaminoglicanos tales como hialuronano presentan un efecto estabilizador para permitir que los liposomas se sometan a liofilización (deseccación por congelación) y rehidratación sin que exista un impacto en la estructura de los liposomas.

De acuerdo con una realización de la invención, la molécula 50 dirigida puede ser un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo se puede dirigir a una molécula que se expresa de manera única en un tipo de célula específica. Una molécula "que se expresa de manera única" en un tipo de célula específica se refiere a una molécula que se presenta de manera principal en la superficie de un tipo de célula específica, y, de manera general, no se presenta, o se presenta en niveles relativamente bajos en otros tipos de células en un organismo. El tipo de célula puede ser linfocitos, linfocitos activados, leucocitos, células hematopoyéticas, megacariocitos o plaquetas. El anticuerpo se puede dirigir a un dominio extracelular de una molécula de superficie celular o una molécula de adhesión celular (CAM). Una CAM es una proteína ubicada en la superficie de una célula, estando involucrada la proteína en la unión con otra célula o con la matriz extracelular. La CAM puede ser una integrina. Las integrinas están compuestas por dos subunidades conocidas como las subunidades alfa y beta. Se conoce que existen múltiples tipos de unidades alfa y unidades beta en los seres humanos. Se conoce que las integrinas adoptan tres estados conformacionales principales: inactivo (baja afinidad), activo (alta afinidad) y ocupado por ligando, en el que la integrina se une a un ligando. Las integrinas experimentan cambios conformacionales cuando se transforman de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad al "abrirse" para permitir una unión más fácil del ligando.

De acuerdo con una realización de la invención, aproximadamente 20 a 70 moléculas de anticuerpo se presentan como molécula dirigida en cada liposoma 10.

De acuerdo con una realización de la invención en la que el liposoma 10 es un HTL, la molécula 50 dirigida puede ser un anticuerpo que se dirige a una molécula que se expresa de manera única en linfocitos, preferentemente en linfocitos activados. La molécula puede ser una CAM que se expresa de manera principal mediante linfocitos. El anticuerpo se puede dirigir al antígeno 1 relacionado con la función linfocitaria (LFA-1). El anticuerpo se puede dirigir a una conformación del antígeno 1 relacionado con la función linfocitaria (LFA-1). El anticuerpo se puede dirigir a una subunidad β o una subunidad α , preferentemente, la subunidad $\beta 2-1$ o la subunidad $\alpha L-I$. El anticuerpo se puede unir a un epítipo que comprende la secuencia CPNKEKEC, en adelante, denominada SEQ ID NO. 8, en particular, los aminoácidos Glu173 y Glu175. El anticuerpo puede ser mAb24 (HM2183), KIM127 o AL-57.

De acuerdo con una realización de la invención en la que el liposoma 10 es un WTL, la molécula 50 dirigida puede ser un anticuerpo que se dirige a una molécula que se expresa de manera única mediante un linfocito, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito, un granulocito, un megacariocito o una plaqueta. El anticuerpo se puede dirigir

a una CAM, preferentemente, a un dominio extracelular de una molécula de adhesión celular. La molécula de adhesión celular puede ser una integrina. El anticuerpo se puede dirigir a una integrina en su conformación de baja afinidad. En una realización de la invención, el anticuerpo se dirige a una integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

5 De acuerdo con una realización de la invención, el liposoma 10 se fabrica mediante el uso de sonicación y extrusión. El enlazador 40 se puede conjugar con el liposoma 10 mediante el uso de un agente de acoplamiento tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) para formar un enlace amida. El agente 30 terapéutico se puede introducir en el liposoma 10 mediante una combinación opcional con protamina y mezcla. La molécula 50 dirigida se puede conjugar con el enlazador 40 mediante acoplamiento de amina, de manera opcional, mediante el uso de un agente de acoplamiento tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida).

10 Otras realizaciones de la invención se refieren a procedimientos de tratamiento de enfermedades que comprenden la administración a un paciente que así lo necesita de liposomas HTL o WTL. Los liposomas HTL se pueden administrar para tratar neoplasias malignas, que incluyen, pero sin limitación, neoplasias malignas hematopoyéticas. Las neoplasias malignas que se tratan pueden incluir leucemia linfocítica aguda del precursor B o el precursor T (ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (LLC) y linfoma no Hodgkin (NHL). Los liposomas WTL se pueden administrar para tratar a pacientes que padecen WAS y/o XLT.

15 En una realización de la invención, los liposomas se combinan con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica. En una realización de la invención, la composición farmacéutica se adapta para uso humano o animal mediante administración oral, rectal, vaginal, tópica, nasal, oftálmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa.

20 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con una realización de la invención se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y se preparan mediante cualquiera de los procedimientos que se conocen bien en la técnica farmacéutica. En una realización de la invención, la forma de dosificación unitaria se encuentra en forma de comprimido, cápsula, pastilla, oblea, parche, ampolla, vial o jeringa precargada.

25 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con realizaciones de la invención se administran, de manera general, en forma de una composición farmacéutica que comprende al menos un componente activo junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 Para la administración oral, una composición farmacéutica se puede presentar en forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y similares. Los comprimidos que contienen diversos excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio se emplean junto con diversos desintegradores tales como almidón y, preferentemente, almidón de patata o tapioca y determinados silicatos complejos, junto con agentes aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y goma arábiga. De manera adicional, los agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio y talco resultan frecuentemente muy útiles para la formación de comprimidos. Las composiciones sólidas de un tipo similar se emplean, además, como cargas en cápsulas de gelatinas blandas y duras; materiales preferidos a este respecto incluyen, además, lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular. Cuando resultan convenientes las suspensiones acuosas y/o los elixires para administración oral, los componentes de esta invención se pueden combinar con diversos agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones similares de estos.

35 40 Las composiciones de acuerdo con realizaciones de esta invención se pueden administrar, además, en una formulación de liberación controlada, tal como una formulación de liberación lenta o de liberación rápida. La composición de la dosis de liberación controlada como tal se puede preparar mediante el uso de procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica.

45 Para la administración parenteral, se pueden emplear soluciones en aceite de sésamo o cacahuete o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las sales solubles en agua correspondientes. Tales soluciones acuosas se pueden regular con tampón de manera adecuada, si resulta necesario, y el diluyente líquido se puede volver isotónico en primer lugar con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas resultan, de manera especial, adecuadas para inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

50 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con realizaciones de la invención pueden contener una cantidad activa del 0,1 % al 95 % de liposoma, preferiblemente del 1 % al 70 %.

En una realización de la invención, la dosis de liposoma se encuentra entre 0,001 mg/kg y 10 mg/kg. La dosis se puede administrar a diario, tres veces por semana o una vez por semana.

55 De acuerdo con una realización de la invención, los liposomas se administran a un paciente que así lo necesita en combinación con un agente anticanceroso adicional. En una realización de la invención, el agente anticanceroso se selecciona a partir del grupo que consiste en doxorubicina, asparaginasa, metotrexato, citarabina, denileucina difitox, rituximab, daunorubicina, 0, ciclofosfamida, vincristina, fludarabina y dexametasona.

Las realizaciones de la invención se describirán de manera adicional en los ejemplos que siguen a continuación.

Ejemplo 1A: sobreexpresión de WASp y WIP en células malignas hematopoyéticas.

Se examinaron los cambios moleculares en la expresión de WASp y WIP mediante la comparación de la expresión de WASp y WIP en células cancerosas humanas que se relacionan con linfocitos de sangre periférica normales (PBL). Se derivaron líneas celulares malignas de neoplasias malignas hematopoyéticas. Los PBL se aislaron a partir de sangre entera de donantes sanos, mediante el uso del gradiente de Ficoll, continuando con la expansión de los linfocitos mediante el uso de fitohemaglutinina (PHA) e interleucina-2. Las células se lisaron mediante el uso de tampón de lisis que contenía Tris. Los lisados de proteínas se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos primarios apropiados (anti-WASp de ratón o anti-WIP de conejo o anti-GAPDH de ratón). Se detectaron proteínas inmunorreactivas con ya sea, anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano, continuando con detección mediante quimioluminiscencia potenciada. Se detectó una sobreexpresión 2 a 6 veces mayor de WASp y WIP en extractos celulares derivados de diversas células malignas hematopoyéticas que incluyen ALL, CLL y NHL. En particular, la sobreexpresión de ambas proteínas se encuentra fuertemente correlacionada. Estos resultados indican que dirigirse a los linfocitos en los que la expresión de WASp y WIP aumenta e interferir con la sobreexpresión de WASp y WIP puede resultar una terapia útil para las neoplasias malignas hematopoyéticas.

Ejemplo 1B: la sobreexpresión de WASp regula al alza la invasión de células hematopoyéticas.

Los efectos de WASp en la invasión celular se analizaron mediante el uso de un ensayo en base a gelatinasa. Los linfocitos transfectados con un plásmido que codifica WASp expresó niveles dos veces mayores de WASp y exhibió una mayor actividad de gelatinasa en comparación con las células transfectadas con un plásmido de control en el que los niveles de expresión de WASp no se duplicaron. La actividad de la gelatinasa representa la degradación de ECM, que acompaña normalmente a la invasión celular. La degradación de ECM se localizó conjuntamente con la acumulación de F-actina como se muestra mediante tinción con faloidina. Estos resultados muestran que la sobreexpresión de WASp se relaciona con un aumento de la capacidad de invasión celular. La reducción de la expresión de WASp en células malignas puede reducir la capacidad de invasión de las células, reduciendo así las metástasis malignas.

Ejemplo 1C: la acumulación de WASp potencia la migración de linfocitos.

Se realizaron imágenes en tiempo real de células que expresan WASp de proteína fluorescente amarilla activada (YFP), realizando la comparación entre células que expresan WASp de tipo salvaje y células que expresan WASp mutante no degradante acumulativo, que se truncan en su N-terminal. Las células se monitorearon mediante el uso de un microscopio confocal, equipado con láseres, filtros y detectores apropiados. Las células que expresan WASp mutante no se diseminaron de manera normal; en su lugar, se movieron y migraron de manera continua. No formaron estructuras de membrana planas (lamelipodios), sino que produjeron protuberancias de membrana de tipo espiga (filopodios), las cuales caracterizan células cancerosas en migración. Estos resultados muestran, además, que la acumulación de WASp en las células se puede asociar con la presencia de estructuras celulares cancerosas en esas células. Al controlar la expresión de WASp mediante el uso de HTL, las características malignas se pueden reducir.

Ejemplo 1D: la acumulación de WASp potencia la activación de linfocitos.

Se utilizaron linfocitos como se describe en el Ejemplo 1C para evaluar el efecto de la acumulación de WASp en la activación de linfocitos, mediante la medición de la concentración de calcio intracelular y la actividad del factor de transcripción, el factor nuclear de células T activadas (NFAT), que son indicadores de la activación y proliferación de linfocitos, respectivamente. Los niveles de calcio se determinaron mediante el uso de espectrofluorometría utilizando fluorocromo Fluo-3 sensible al calcio y mediante la cotransfección con un plásmido reportero de luciferasa NFAT. Las células en la que se expresó y acumuló YFP-WASp mutante mostraron un aumento significativo tanto de la concentración de calcio intracelular como de los niveles de NFAT. Los resultados indican que la acumulación de WASp en linfocitos puede aumentar la activación y la proliferación de linfocitos.

Ejemplo 1E: la expresión de WASp se silencia a nivel del gen de manera eficaz a continuación del tratamiento con ARNip de WASp específico.

Como se muestra en los ejemplos anteriores, WASp se sobreexpresa en células malignas. Se analizó el silenciamiento génico de la expresión de WASp mediante el uso de ARNip. WASp se silenció utilizando oligonucleótidos de ARNip disponibles comercialmente. Se introdujo una mezcla de los siguientes oligonucleótidos, cada uno en forma de dúplex de ARNip bicatenario con su secuencia correspondiente en una cantidad de 500 picomol en 1×10^7 células: 5'-GCCGAGACCUCUAAACUUA-3' (SEQ ID NO. 4), 5'-UGACUGAGUGGCUGAGUUA-3' (SEC ID NO. 1), 5'-GAAUGGAUUUGACGUGAAC-3' (SEC ID NO. 3) y 5'-GACCUAGCCCAGCUGAUAA-3' (SEQ ID NO. 2). Estos experimentos se realizaron en células leucémicas de células T. Se logró una eficacia de silenciamiento de aproximadamente el 90 % en 48 horas después de la transfección, en comparación con células que se trataron con ARNip no específico (N.S).

Este ejemplo indica que el ARNip, cuando se introduce en células malignas hematopoyéticas, resulta eficaz para reducir la expresión de WASp y puede resultar útil para evitar la propagación y la metástasis de la neoplasia maligna.

El HTL de acuerdo con realizaciones de la invención se puede utilizar para dirigirse a células malignas hematopoyéticas e introducir ARNip en estas.

Ejemplo 2A: fabricación de liposomas de acuerdo con realizaciones de la invención.

5 Los liposomas recubiertos con anticuerpos para su uso como HTL o WTL se pueden preparar como sigue a continuación. Como primer paso, se preparan vesículas multilaminares (MLV) que se componen de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) en proporciones molares de 6:2:2 (o, de manera alternativa, 6:2:1,9 con la adición de DPPE al 0,1 % etiquetado con fluoróforo de rodamina, para detección). La mezcla de lípidos se disuelve en cloroformo hasta alcanzar una concentración final de 2 miligramos por mililitro (mg/ml), mediante agitación durante 35 a 40 minutos (min), a 60 grados Celsius (°C). Esto continúa con evaporación rotatoria al vacío durante 30 min a 65 °C. La mezcla de lípidos se seca de manera adicional en un desecador al vacío durante la noche. La película de lípidos seca que se obtiene como resultado se hidrata con solución salina diluida regulada con tampón de fosfato (PBS) a un pH de 7,4, se agita vorticialmente por completo y se mezcla luego, mediante el uso de un agitador orbital a 200 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 2 h a 37 °C para crear MLV.

15 Luego, las MLV se someten a 7 ciclos de congelación-descongelación rápida, utilizando nitrógeno líquido y un termobloque que se configura a 65 °C, y se extruden luego con un dispositivo de extrusión manual a 65 °C, para lograr vesículas unilaminares (ULV) con un tamaño final de -100 nanómetros (nm) de diámetro. La extrusión se realiza en dos pasos, utilizando, de manera progresiva, membranas de policarbonato de tamaño de poro en reducción, de 0,2 a 0,1 micrómetros (mm), con 10 ciclos por tamaño de poro, para formar ULV.

20 El enlazador (que comprende hialuronano) se conjuga con ULV mediante la disolución de 1 mg de hialuronano (HA; 700 kDa de peso molecular) mediante agitación (37 °C durante 30 min) en tampón de acetato de sodio 0,1 molar (M). Luego, HA se preactiva con 20 mg de agente de acoplamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, pH= 4,0) mediante agitación durante 2 h a 37 °C. La suspensión de ULV extruida se ultracentrifuga luego durante 1 a 3 h, continuando con resuspensión del sedimento en tampón borato 0,1 M (pH= 8,6). La suspensión de ULV y HA activado se combinan en una tasa 1:1 en volumen y se incuban durante la noche a 37 °C, con agitación moderada. El HA libre se separa de los HA-ULV mediante 3 lavados, utilizando una ultracentrifuga (10⁵ g, 4 °C, durante 1 h para cada lavado).

30 Se realiza el acoplamiento de anticuerpo monoclonal (mAb) a liposomas recubiertos de HA (mediante el uso de un procedimiento de acoplamiento de amina) como sigue a continuación. 50 microlitros (µl) de liposomas recubiertos con HA se activan mediante incubación con 200 µl de EDAC 400 mM y 200 µL de N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM durante 20 min a temperatura ambiente, con agitación suave. Los liposomas HA activado-NHS-EDAC se mezclan con 50 µl (-25 µg) del mAb conveniente (0,5 mg/ml en PBS, pH= 7,4), continuando con incubación durante la noche a temperatura ambiente con agitación suave. Un anticuerpo ejemplar que se puede utilizar para HTL incluye KIM127 o mAb24 (HM2183). KIM127 se ha descrito con anterioridad en el siguiente documento, que se incorpora como referencia: Stephens P, Romer JT, Spitali M, Shock A, Ortlepp S, Figdor CG, Robinson MK. KIM127, an antibody that promotes adhesion, maps to a region of CD18 that includes cysteine-rich repeats. *Cell Adhes Commun.* 1995 Dec;3(5):375-84. PubMed PMID: 8640375. Lu C, Ferzly M, Takagi J, Springer TA. Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5629-37. PubMed PMID: 11313403. Para WTL, se pueden utilizar tanto los anticuerpos contra LFA-1 (para linfocitos) como los anticuerpos que reconocen megacariocitos e integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ específicas de plaquetas (CD41). Los residuos reactivos se bloquean con 20 µl de etanolamina HCl (1 M; pH= 8,5).

Los liposomas que se obtienen como resultado se purifican mediante el uso de una columna de exclusión por tamaño que se empaqueta con perlas de sefarosa CL-4B (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) y se equilibra con una solución tampón en base a HEPES (HBS, pH= 7,4), lo que retira los mAb no ligados.

45 Las suspensiones de liposomas purificadas se congelan de manera instantánea en alícuotas de 200 µl en una mezcla de etanol al 100% y hielo seco durante -20 min a 30 min, continuando con congelación durante 2 h a 4 h a -80 °C. Las alícuotas congeladas se liofilizan luego durante 48 h mediante el uso de un dispositivo liofilizador. Los liposomas liofilizados se almacenan a -80 °C hasta su uso posterior.

50 Medidas de distribución de tamaño de partícula y potencial zeta: se miden la distribución del tamaño de partícula y el diámetro medio del liposoma recubierto de anticuerpo y los liposomas no recubiertos de control mediante el uso de un potencial zeta y un instrumento de dispersión de luz dinámica de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las mediciones se realizan en PBS (pH= 7,4) a temperatura ambiente.

55 El tamaño de los liposomas que se forman de acuerdo con el procedimiento anterior sin anticuerpo fue de 103,03 nm ± 0,92 nm de diámetro; y con anticuerpo, de 138,29 nm ± 0,27 nm de diámetro. Los potenciales zeta para liposomas sin anticuerpos y sin HA fueron -8,1 ± 0,51 milivoltios (mV); sin anticuerpo y con HA fueron -17,8 mV ± 1,2 mV; y con anticuerpo y HA: -24,1 mV ± 2,9 mV.

Se realizan la encapsulación de agentes terapéuticos (péptidos, moléculas pequeñas u oligonucleótidos) y la cuantificación de la eficacia de atrapamiento como sigue a continuación: los liposomas liofilizados (10 µg a 100 µg de lípidos totales) se hidratan con 200 µl de dietilpicrocarbonato (DEPC) que se trata con agua con o sin ARNip (50 a 750

5 picomol). Los ARNip se mezclan con protamina recombinante de longitud completa (1:5, proporción molar de ARNip: protamina), en agua libre de nucleasas, continuando con incubación durante 20 min a temperatura ambiente para formar un complejo. Los liposomas se agitan suavemente durante 30 min a temperatura ambiente. Los ARNip no encapsulados se retiran mediante centrifugación ultrarrápida (6,4 x g, 4 °C, 20 min) antes de agregar la suspensión a las células. La eficacia de encapsulación de ARNip se determina mediante el ensayo de ARN Quant-iT RiboGreen (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficacia de atrapamiento se determina comparando la fluorescencia de la coloración de unión al ARN RiboGreen en los liposomas, en presencia y ausencia de un detergente, Triton X-100. En ausencia de detergente, la fluorescencia se mide a partir de ARNip accesible (no atrapado) solamente. 10 Mientras que, en presencia de detergente, la fluorescencia se mide a partir del ARNip total. El % de encapsulación se calcula mediante la ecuación:

% de encapsulación de ARNip = $\left[1 - \left(\frac{\text{conc. de ARNip libre}}{\text{conc. de ARNip total}}\right)\right] \times 100$. El porcentaje de encapsulación es aproximadamente del 60 % al 95 % de encapsulación.

15 Para la carga de péptidos, los liposomas liofilizados (10 µg a 100 µg de lípidos totales) se hidratan con 200 µl de PBS que contienen el péptido (a una proporción molar fosfolípido:péptido de 250:1), y se hidratan a 40 °C durante 1 h mediante agitación vorticial repetida. La carga de péptidos se cuantifica utilizando péptido etiquetado con fluorescencia (etiquetado con Cy3, Pep(Cy3)) y la separación se realiza mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Sephadex G 75. Pep(Cy3) se eluye como una sola banda junto con los liposomas (péptido relacionado con liposomas). En comparación, el Pep(Cy3) libre que se utilizó como control, no muestra una sola banda, pero produce manchas a lo largo de la columna. La fracción relacionada con liposomas se recolecta y cuantifica con el uso de un espectrofluorómetro en comparación con una muestra que contiene Pep(Cy3) no separado (total). El % de encapsulación se calcula mediante la ecuación:

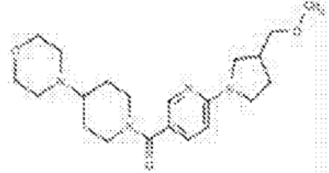
$$\% \text{ de encapsulación de péptido} = \left[\frac{\text{intensidad de Cy3 relacionado con liposoma}}{\text{intensidad de Cy3 total}} \right] \times 100.$$

Ejemplo 2B: compuestos que modulan la expresión de WASp

25 Los compuestos se obtuvieron de ChemBridge Corporation. San Diego, CA, EE. UU. De los compuestos obtenidos, 14 se consideraron agentes potenciales para modular la expresión de WASp, por su potencial para unirse a WASp. Se analizaron 14 compuestos en células 293T mediante el uso del siguiente procedimiento.

Los compuestos se disolvieron de manera individual en DMSO para preparar una solución madre 20 milimolar (mM) y se mantuvieron almacenados a -20 °C. Se prepararon células 293T hasta la fase logarítmica media, confluencia del -60 % al 80 %, y se transfectaron con 15 µg de proteína amarilla fluorescente, plásmido YFP-WASp (6023), mediante el uso de un protocolo de transfección de fosfato de calcio. Las células se recolectaron y se recitaron. 1 a 2 x 10⁶ células por muestra en 6 pocillos complementados con 2 ml a 4 ml de medio DMEM completo (FCS al 10 %) (0,5 x 10⁶ células/ml). Las células se colocaron en 6 pocillos (0,5 x 10⁶ células/ml x número de muestras) y se preincubaron a 37 °, CO₂ al 5 % durante al menos 4 h (para que las células se adhieran. Se tomó 1 ml del medio en el que se cultivaron las células y se agregó al compuesto (10 µM a 80 µM). El medio, con el compuesto, se volvió a agregar a las células de la placa, gota a gota. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C, CO₂ al 5 %. Análisis densitométrico de la expresión de YFP-WASp en las células que se trataron con los compuestos, mediante el uso de análisis de transferencia Western. Los compuestos con un cambio relativo de 1,5 veces (ya sea aumento o reducción) de la expresión con respecto a las células que se expusieron al control de disolvente DMSO, se enumeran en la tabla 2 a continuación. La tabla 2 enumera la modulación de los compuestos de los niveles de expresión de WASp como una función de la expresión relativa de WASp con respecto al control. 40

Tabla 2:

N.º de compuesto	Nombre químico	Estructura
4	4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il}carbonil)piperidin-4-il]morfolina	

(continuación)

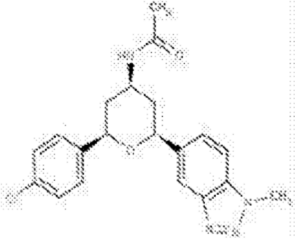
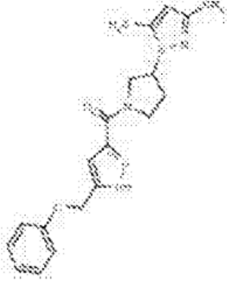
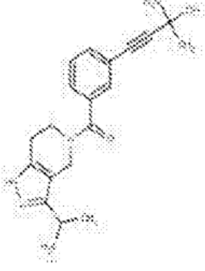
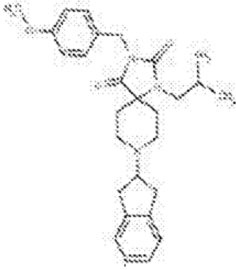
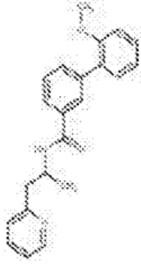
Nro. de compuesto	Nombre químico	Estructura
6	N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida	
7	3,5-dimetil-1-(1-[[5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il]carbonil]pirrolidin-3-il)-1H-pirazol	
10	4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il)carbonil]fenil}-2-metilbut-3-in-2-ol	
13	8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona	
14	2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-iletil)bifenil-3-carboxamida	

Tabla 3:

Número de compuesto	Expresión relativa
4	1,5
6	6,7
7	2,1
10	0,6
13	0,3
14	0,5

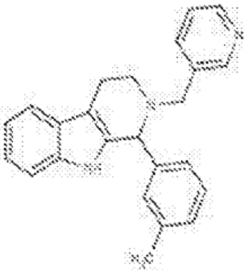
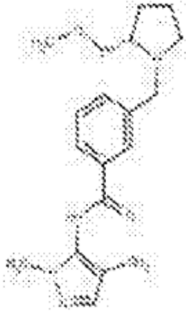
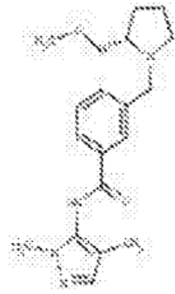
5 Este ejemplo muestra que los compuestos 4, 6 y 7 aumentan la expresión de WASp en las células. Estos compuestos y/o la WTL que comprende estos compuestos se pueden utilizar en el tratamiento de WAS u otras enfermedades.

El ejemplo muestra, además, que los compuestos 10, 13 y 14 resultan eficaces para reducir la expresión de WASp en las células. Estos compuestos y/o la WTL que comprende estos compuestos se pueden utilizar en el tratamiento de neoplasias malignas.

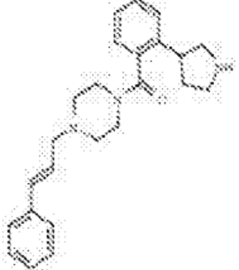
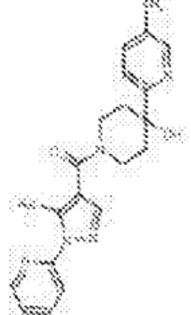

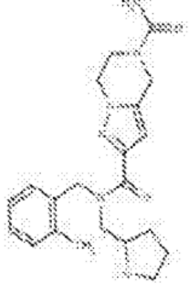
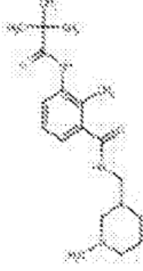
Se pueden utilizar compuestos adicionales incluidos los compuestos que se enumeran la tabla 4:

10

Tabla 4:

Nro. de compuesto	Nombre químico	Estructura
1	1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina	
2	N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida	
3	N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-(((2S)-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il)metil)benzamida	

(continuación)

Nro. de compuesto	Nombre químico	Estructura
5	1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina	
8	4-(5-metilpiridin-2-il)-1-[(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)carbonil]piperidin-4-ol	
9	N-(3-metilbencil)-N'-{[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il]metil}urea	
11	5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida	
12	3-[(2,2-dimetilpropanoil)amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida	

Ejemplo 2C: ARNip que reduce la expresión de WASp.

Se analizaron varios dúplex de ARNip en células como en el ejemplo IE. Se utilizaron las siguientes secuencias de ARNip bicatenario: SEQ ID NO. 1 y su secuencia complementaria; SEQ ID NO. 2 y su secuencia complementaria; SEQ ID NO. 3 y su secuencia complementaria; SEQ ID NO. 4 y su secuencia complementaria (designadas como 1 a 4). Se utilizaron 500 picomol de cada ARNip bicatenario. De manera adicional, una secuencia de ARNip sin sentido (designada como "ARNip N. S.") se utilizó como control. El ARNip N. S. de control se constituyó a partir de 125 dúplex de cada una de las moléculas de ARNip en la Tabla 5:

Tabla 5:

SEQ ID NO.	Secuencia
9	5'-UAGCGACUAAACACAUCAAUAGGCCUAUGAAGAGAUAC
10	5'-AUGUAUUGGCCUGUAUUAG
11	5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA
12	5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA

De manera adicional, se utilizó una mezcla de ARNip que comprende las SEQ ID NOS. 1 a 4 (designadas como "Mezcla"), que comprenden 125 picomoles de cada una. Tras el análisis mediante transferencia Western, se demostró que todos los dúplex de ARNip resultaron eficaces para regular WASp a la baja, resultando el ARNip de la SEQ. ID NO. 1 el ARNip individual más eficaz que se utilizó. El ARNip N. S. resultó ineficaz para regular WASp a la baja. Un gráfico de barras que detalla la expresión relativa de WASp con respecto a las células de control (sin tratar) se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2D: péptidos inspirados en WIP

De acuerdo con realizaciones de la invención, se pueden constituir péptidos inspirados en WIP. Los péptidos inspirados en WIP son péptidos que son similares a secciones de péptidos WIP de origen natural, con modificaciones potenciales. De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos inspirados en WIP tienen un 90% de similitud con respecto a la sección correspondiente de WIP de origen natural. De acuerdo con una realización de la invención, los péptidos inspirados en WIP se unen a WASp en los residuos de lisina 76 y 81, los cuales, según se ha observado, son sitios de ubiquitilación de WASp. Sin pretender estar ligado a teoría alguna particular, se sugiere que los péptidos inspirados en WIP se unen a estos residuos de lisina de WASp, protegiendo así a WASp de la ubiquitilación y la degradación posterior.

Los péptidos inspirados en WIP se preparan mediante el uso del siguiente procedimiento. Se empleó una construcción de fusión de proteína de unión a maltosa (MBP) que contiene una etiqueta His₆ para purificación y un sitio de proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) para expresar péptidos inspirados en WIP de manera eficaz. La secuencia de codificación de péptido-MBP-His-Tev se amplificó en células de *E. coli* DH5α y se transformó en células de expresión BL21 (DE3). Los péptidos inspirados en WIP se expresaron en medio mínimo M9 mediante el uso de protocolos convencionales. Las células se cultivaron a 37 °C hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,8 a 1,0. Luego se agregó isopropiltiogalactosa (IPTG) a una concentración final de 1,0 mM y la inducción procedió a 27 °C durante la noche. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en tampón de lisis (tampón Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, benzamidina 5 mM y DTT 1 mM). Las células se lisaron por homogeneización (homogeneizador C5, Avestin), continuando con la adición de una segunda alícuota de benzamidina 5 mM y PMSF 1 mM y el lisado se clarificó mediante centrifugación. El lisado se aplicó en una columna quelante Hi Trap HP(GE Healthcare, Inc.) que se cargó con Ni²⁺, y después del lavado con tampón de lisis, la proteína se eluyó en tampón de lisis que contenía imidazol 50 mM. La diálisis durante la noche frente al tampón de lisis permitió la escisión de la proteasa TEV (agregada 1:40 p/p) durante 3 h a 30 °C. Inmediatamente después de la escisión, la reacción se cargó de nuevo en la columna y se recolectó la proteína en el flujo continuo que luego se dializó durante la noche a temperatura ambiente frente a Tris 20 mM pH 7,5. Finalmente, la proteína se aplicó en una columna de intercambio catiónico equilibrada con Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 10 mM. La columna se lavó en tampón de Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM y se eluyó a medida que la concentración de NaCl se elevaba a 125 mM. El pH del grupo que contenía el péptido se redujo a 3,0 mediante el uso de tampón de formiato 1 M a una concentración final de 50 mM, lo que permitió que la proteína se concentrara de manera segura en un tubo de concentración centrífuga (MWCO 3 kDa, Vivaspín) hasta un volumen final de 0,5 ml. Se emplearon diluciones y concentraciones seriadas de la proteína con formiato 5 mM pH 3,0 para retirar el fosfato y el NaCl del tampón. El pH se ajustó luego a pH 5,8-7,0 y los péptidos purificados que se obtuvieron como resultado se liofilizaron y se congelaron a -80 °C para su almacenamiento.

Los siguientes péptidos de la tabla 6 se pueden sintetizar de acuerdo con las realizaciones de la invención:

Tabla 6:

SEQ. ID NO:	En base a residuos WIP	Secuencia
13	442-492	MGSSHHHHHH SGQDSPCEDE WESRFYFHPI SDLPPPEPYV QTTKSYPSKL ARNESRSGSN PRE
14	461-481	DLPPPEPYVQ TTKSYPSKLA R
15	442-485	MGSSHHHHHH SGQDSPCEDE WESRFYFHPI SDLPPPEPYV QTTKSYPSKL ARNESR

5 Se sugiere que estos péptidos pueden unirse a los residuos de lisina 76 y/o 81 de WASp, protegiendo así a WASp de la ubiquitilación y la degradación posterior.

Ejemplo 3A: uso de WTL en el tratamiento de WAS *in vivo*.

10 Se utilizan ratones con inactivación de WAS. Los compañeros de camada de tipo salvaje (WT) se utilizan como controles. Los ratones se alojan en condiciones libres de patógenos. Las suspensiones (200 µl) de liposomas que comprenden péptidos que se unen a WASp en sitios de degradación de WASp y que evitan la degradación de WASp, ya sea por ubiquitilación o por proteólisis mediada por calpaína, se sonicen en un baño de ultrasonido durante 5 min y se inyectan de inmediato por vía intravenosa a través de las venas de la cola. El peso corporal y los síntomas clínicos se controlan a diario. Los ratones se sacrifican el día 9 y se les retira el bazo. Las líneas celulares de linfocitos y megacariocitos se purifican y analizan para determinar los niveles de expresión de WASp.

15 El tratamiento con WTL puede aumentar la cantidad de WASp que se expresa de manera correcta en ratones con inactivación de WAS. Los síntomas clínicos se pueden mejorar en los ratones que se tratan con WTL con respecto a los ratones de control.

Ejemplo 3B: uso de HTL en el tratamiento de neoplasias malignas *in vivo*.

20 Se adquieren ratones hembra NOD/SCID (NOD/LtSz-scid/scid) de 5 a 6 semanas y se alojan en un ambiente libre de patógenos. El día de la inoculación, los ratones reciben 250 centigray (cGy) de irradiación corporal total a una tasa de dosis de 325 cGy/min mediante rayos X paralelos opuestos de 4MV. De manera inmediata antes de la inoculación, los ratones reciben calor con una lámpara infrarroja, se inoculan luego mediante inyección en la vena de la cola con entre 2,5 y 10 x 10⁶ células leucémicas en un volumen máximo de 100 ml de PBS. Los ratones se controlan cada 14 días con respecto al injerto de leucemia mediante tinción de aproximadamente 50 ml de sangre periférica que se extrae de la vena de la cola con anticuerpos anti-CD45 (antígeno común de leucocitos, Ly-5), Anti-CD45 humano anti-murino conjugado con FITC y conjugado con PE. A continuación de la lisis de eritrocitos con cloruro de amonio, las muestras se analizan mediante citometría de flujo. Se calcula la proporción de células CD45 humanas frente a las murinas. Se ha demostrado que este parámetro refleja con precisión la carga leucémica global. Este procedimiento debería detectar el 1 % de células CD45 humanas en sangre periférica murina.

30 Los xenoinjertos continuos se establecen mediante la recolección de células leucémicas humanas de los bazos de ratones injertados, de manera exacta como se describe arriba. Las preparaciones de células T-ALL se utilizan para establecer xenoinjertos ALL continuos infantiles a partir de bazos de ratones que consistían en, de manera habitual, más de 3 x 10⁸ células por bazo con una pureza mayor del 85 %. Antes de la inoculación en ratones receptores secundarios o terciarios, las células se descongelan de manera rápida en medio RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino (FBS) al 20 %.

35 Para una comparación de las tasas de injertos secundario y terciario con respecto a la tasa de injerto primario, se inoculó el mismo número de células leucémicas humanas en cada caso. La administración de HTL puede mostrar una mejora en la carga leucémica general.

40 Se proporciona, además, de acuerdo con una realización de la invención, un liposoma que comprende: una bicapa lipídica que presenta una cavidad interna; un agente terapéutico en la cavidad interna que se configura para modificar la expresión o la degradación de WASp en una célula; y una fracción dirigida externa con respecto a la bicapa lipídica que se configura para dirigirse a un dominio extracelular de una célula. De manera opcional, la fracción dirigida comprende un anticuerpo. De manera opcional, la fracción dirigida comprende un agente que se une a una molécula que se expresa de manera preferente o única en la superficie de una célula hematopoyética. De manera opcional, la célula hematopoyética es un linfocito. De manera opcional, la molécula en la superficie de la célula hematopoyética se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de adhesión celular y una integrina. De manera opcional, la integrina es una conformación de alta afinidad del antígeno 1 relacionado con la función linfocitaria. De manera

opcional, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido o un oligonucleótido. De manera opcional, el agente terapéutico se une a WASp. De manera opcional, el agente terapéutico, cuando se pone en contacto con una célula que expresa WASp, reduce la expresión de WASp en la célula. De manera

5 opcional, el agente terapéutico comprende ARNip, ARNhc o ARNmi. De manera opcional, el ARNip comprende un oligonucleótido que presenta la secuencia de la SEQ ID NO. 1, la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3, la SEQ ID NO. 4, la SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 7 y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido. De manera opcional, la fracción dirigida comprende un agente que se une a una molécula que se expresa de manera única o preferente en la superficie de un leucocito, una célula hematopoyética, un megacariocito

10 o una plaqueta. De manera opcional, la molécula se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de adhesión celular y una integrina. De manera opcional, la integrina se encuentra en su conformación de baja actividad. De manera opcional, la fracción dirigida comprende un agente que se une a una integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. De manera opcional, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una molécula, un péptido y un oligonucleótido. De manera opcional, el agente terapéutico se une a una proteína WAS. De manera opcional, el agente terapéutico, cuando se pone en contacto con WASp, se une a un sitio de ubiquitilación. De manera opcional, el sitio de ubiquitilación es un residuo de lisina 76 u 81. De manera opcional, el agente terapéutico, cuando se pone en contacto con una célula que expresa WASp, reduce la degradación de WASp en la célula. De manera opcional, el agente terapéutico, cuando se pone en contacto con una célula que expresa WASp, reduce la proteólisis de WASp mediante proteasa con cisteína calpaina. De manera opcional, la bicapa lipídica comprende un fosfolípido. De manera opcional, el fosfolípido comprende fosfatidilcolina o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE). De manera opcional, la bicapa lipídica comprende un esteroles. De manera opcional, el esteroles es colesterol. De manera opcional, la bicapa lipídica comprende fosfatidilcolina, DPPE y colesterol. De manera opcional, la proporción de fosfatidilcolina, DPPE y colesterol en la capa de bilípidos es aproximadamente 6:2:2. De manera opcional, el diámetro promedio de los liposomas en una pluralidad de liposomas se encuentra entre aproximadamente 100 nanómetros y aproximadamente 170 nanómetros.

25 De manera opcional, el liposoma comprende además un enlazador. De manera opcional, el enlazador comprende un glicosaminoglicano. De manera opcional, el glicosaminoglicano comprende hialuronano. De manera opcional, el anticuerpo se une a un epítipo que comprende la SEQ ID NO. 8. De manera opcional, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: mAb24 (HM2183), KIM127 y AL-57. De manera opcional, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il]carbonil]piperidin-4-il]morfolina, N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-ilo]acetamida, 3,5-dimetil-1-(1-[[5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il]carbonil]pirrolidin-3-il)-1H-pirazol, 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il]carbonil]fenil)-2-metilbut-3-in-2-ol, 8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona y 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-ilet)il)bifenil-3-carboxamida. De manera opcional, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: 1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina, N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-[[2S)-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il]metil]benzamida, 1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina, 4-(5-metilpiridin-2-il)-1-[(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)carbonil]piperidin-4-ol,

30 N-(3-metilbencil)-N'-[[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il]metil]urea, 5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida y 3-[[2,2-dimetilpropano]amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida. De manera opcional, el agente terapéutico comprende un péptido que presenta una similitud de al menos el 90 % con respecto a la WIP humana, en el que el péptido se une a WASp en los residuos de lisina 76 u 81. De manera opcional, el péptido comprende las SEC. ID NO. 13, 14 o 15.

Se proporciona, además, de acuerdo con una realización de la invención, procedimientos de tratamiento de una enfermedad en un paciente que comprenden la administración a un paciente que así lo necesita de un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores. De manera opcional, el paciente padece una neoplasia maligna. De manera opcional, la neoplasia maligna es una neoplasia maligna hematopoyética. De manera opcional, la neoplasia maligna hematopoyética es leucemia linfocítica aguda del precursor B o el precursor T (ALL), mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica (LLC) o linfoma no Hodgkin (NHL). De manera opcional, el paciente padece síndrome de Wiskott-Aldrich o trombocitopenia ligada a X.

50 Se proporciona, además, de acuerdo con una realización de la invención, una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en: 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il]carbonil]piperidin-4-il]morfolina,

N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida,

3,5-dimetil-1-(1-[[5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il]carbonil]pirrolidin-3-il)-1H-pirazol,

55 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il]carbonil]fenil)-2-metilbut-3-in-2-ol,

8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona y 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-ilet)il)bifenil-3-carboxamida.

Se proporciona además de acuerdo con una realización de la invención una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que se selecciona grupo que consiste en:

- 1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina,
 N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida,
 N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-[[2-(2S)-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il]metil]benzamida,
 5 1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina,
 4-(5-metilpiridin-2-il)-1-[(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)carbonil]piperidin-4-ol,
 N-(3-metilbencil)-N'-[[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il] metil]urea,
 5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida
 y
 10 3-[(2,2-dimetilpropanoil)amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida.

Se proporciona además, de acuerdo con una realización de la invención, una composición farmacéutica que comprende un vehículo y un compuesto farmacéuticamente aceptables que se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7, y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido.

- 15 Se proporciona, además, de acuerdo con una realización de la invención, un procedimiento de tratamiento de una persona que padece una enfermedad, que comprende la administración de la composición farmacéutica que se describe anteriormente. De manera opcional, la enfermedad es una neoplasia maligna, síndrome de Wiskott-Aldrich o trombocitopenia ligada a X.

- 20 Se proporciona, además, de acuerdo con realizaciones de la invención, un péptido que presenta una similitud de al menos el 90 % con respecto a la WIP humana, en el que el péptido se une a WASp en los residuos de lisina 76 u 81, protegiendo así a WASp de la ubiquitilación y la degradación posterior. De manera opcional, el péptido comprende las SEC. ID NO. 13, 14 o 15.

- 25 Se proporciona, además, de acuerdo con una realización de la invención, un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un paciente que comprende la administración a un paciente que así lo necesita de una composición farmacéutica que comprende un péptido como se describe anteriormente. De manera opcional, la enfermedad es una neoplasia maligna, síndrome de Wiskott-Aldrich o trombocitopenia ligada a X.

En la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente solicitud, cada uno de los verbos "comprender", "incluir" y "presentar" y conjugaciones de estos, se utilizan para indicar que el objeto u objetos del verbo no son necesariamente una lista completa de los componentes, los elementos o las partes del sujeto o sujetos del verbo.

30 **Listado de secuencias**

- <110> Bar Ilan University
 <120> LIPOSOMAS PARA MODULACIÓN DE PROTEÍNA DE SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH
 <130> C025-P1330-PCT
 <150> US 61/830,178
 35 <151> 2013-06-03
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 19
 40 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 <400> 1

	ugacugagug gcugaguua	19
	<210> 2	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 2	
10	gaccuagccc agcugauaa	19
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 3	
	gaauggauuu gacgugaac	19
	<210> 4	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
25	<400> 4	
	gccgagaccu cuaaacuua	19
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 5	
	ugagaugcuu ggacgaaaa	19
35	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> ARNip
 <400> 6
 5 gaucagagg caaagugga 19
 <210> 7
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> ARNip
 <400> 7
 ucucaguucu cuucacuca 19
 <210> 8
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

 Cys Pro Asn Lys Glu Lys Glu Cys
 20 1 5
 <210> 9
 <211> 37
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> ARNip
 <400> 9
 uagcgacuaa acacaucaau aggcuaugaa gagauac 37
 <210> 10
 30 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 35 <400> 10
 auguauuggc cuguauuag 19
 <210> 11

5 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 <400> 11
 augaacguga auugcucaa 19

10 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 15 <400> 12
 ugguuuacau gucgacuaa 19

<210> 13
 <211> 63
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de péptido en base a WIP
 <400> 13

Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Gly	Gln	Asp	Ser	Pro
1				5						10				15	
Cys	Glu	Asp	Glu	Trp	Glu	Ser	Arg	Phe	Tyr	Phe	His	Pro	Ile	Ser	Asp
			20					25					30		
Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Tyr	Val	Gln	Thr	Thr	Lys	Ser	Tyr	Pro	Ser
			35				40					45			
Lys	Leu	Ala	Arg	Asn	Glu	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Asn	Pro	Arg	Glu	
	50					55					60				

25 <210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Fragmento de péptido en base a WIP

ES 2 885 823 T3

<400> 14

Asp Leu Pro Pro Pro Glu Pro Tyr Val Gln Thr Thr Lys Ser Tyr Pro
1 5 10 15

Ser Lys Leu Ala Arg
20

5 <210> 15

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fragmento de péptido en base a WIP

<400> 15

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Gly Gln Asp Ser Pro
1 5 10 15

Cys Glu Asp Glu Trp Glu Ser Arg Phe Tyr Phe His Pro Ile Ser Asp
20 25 30

Leu Pro Pro Pro Glu Pro Tyr Val Gln Thr Thr Lys Ser Tyr Pro Ser
35 40 45

Lys Leu Ala Arg Asn Glu Ser Arg
50 55

REIVINDICACIONES

1. Un liposoma que comprende:

una bicapa lipídica que presenta una cavidad interna;
 un agente terapéutico en la cavidad interna, dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en:

(a) compuestos que aumentan la expresión de WASp o reducen la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan del grupo que consiste en N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida; 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il}carbonil)piperidin-4-il] morfolina y 3,5-dimetil-1-(1-{{5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il}carbonil}pirrolidin-3-il)-1H-pirazol;

(b) compuestos que reducen la expresión de WASp o aumentan la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan del grupo que consiste en 8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona; 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-iletíl)bifenil-3-carboxamida y 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il)carbonil]fenil}-2-metilbut-3-in-2-ol;

(c) compuestos que modulan la expresión o la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan del grupo que consiste en 1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina, N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-{{(2S)-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il}metil}benzamida, 1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina, 4-(5-metilpiridin-2-il)-1-[(5-metil-1-piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]carbonil]piperidin-4-ol, N-(3-metilbencil)-N'-{[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il]metil}urea, 5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida y 3-[(2,2-dimetilpropanoil)amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida;

(d) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7 y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido; y

(e) un péptido que comprende las SEQ. ID NO. 13, 14 o 15; y

un agente que se une a una molécula que se expresa en la superficie de una célula hematopoyética, un leucocito, un megacariocito o una plaqueta, en el que dicha molécula se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una molécula de adhesión celular y una integrina, preferentemente, la integrina es una conformación activa del antígeno 1 relacionado con la función linfocitaria (LFA-1); o (b) una molécula de adhesión celular y una integrina, preferentemente, una integrina; dicho agente es externo con respecto a la bicapa lipídica.

2. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico al ponerse en contacto con una célula, reduce la expresión de WASp o aumenta la degradación de WASp en la célula.

3. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho agente terapéutico es una molécula pequeña que se selecciona del grupo que consiste en 8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona; 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-iletíl)bifenil-3-carboxamida y 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il)carbonil]fenil}-2-metilbut-3-in-2-ol.

4. El liposoma de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en el que el agente terapéutico comprende ARNip, ARNhc o ARNmi, en el que el ARNip comprende un oligonucleótido que presenta la secuencia de la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 1, la SEQ ID NO. 2, la SEC ID NO. 3, la SEQ ID NO. 4, la SEQ ID NO. 5 o la SEQ ID NO. 7 o cualquier mezcla de estas y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido.

5. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico, cuando se pone en contacto con una célula, reduce la degradación de WASp o aumenta la expresión de WASp en la célula.

6. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho agente terapéutico es una molécula pequeña que se selecciona del grupo que consiste en N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida; 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il}carbonil)piperidin-4-il] morfolina y 3,5-dimetil-1-(1-{{5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il}carbonil}pirrolidin-3-il)-1H-pirazol.

7. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho agente terapéutico es un péptido que comprende las SEC. ID NO. 13, 14 o 15.

8. El liposoma de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en: 1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina, N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-{{(2S)-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il}metil}benzamida, 1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina, 4-(5-metilpiridin-2-il)-1-[(5-metil-1-piridin-2-il)-1H-pirazol-4-il]carbonil]piperidin-4-ol, N-(3-metilbencil)-N'-{[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il]metil}urea, 5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida y 3-[(2,2-dimetilpropanoil)amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida.

9. El liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la bicapa lipídica comprende una fosfatidilcolina, DPPE y colesterol, preferentemente, en el que el diámetro promedio de los liposomas se encuentra entre aproximadamente 100 nanómetros y aproximadamente 170 nanómetros.

5 10. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

(a) compuestos que aumentan la expresión de WASp o reducen la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan de N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida; 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il}carbonil)piperidin-4-il] morfolina y 3,5-dimetil-1-(1-
10 {5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il}carbonil)pirrolidin-3-il)-1H-pirazol;

(b) compuestos que reducen la expresión de WASp o aumentan la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan de 8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona; 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-iletíl)bifenil-3-carboxamida y 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il)carbonil]fenil}-2-metilbut-3-in-2-ol;

(c) compuestos que modulan la expresión o la degradación de WASp en una célula, que se seleccionan de 1-(3-metilfenil)-2-(3-piridinilmetil)-2,3,4,9-tetrahidro-1H-beta-carbolina, N-[ciclopropil(4-metilpiridin-2-il)metil]-3-metil-1-propil-1H-pirazol-4-carboxamida, N-(1,4-dimetil-1H-pirazol-5-il)-3-[[2S]-2-(metoximetil)pirrolidin-1-il]metil]benzamida, 1-[(2E)-3-fenil-2-propan-1-il]-4-[2-(3-pirrolidinil)benzoil]piperazina, 4-(5-metilpiridin-2-il)-1-
15 [(5-metil-1-piridin-2-il-1H-pirazol-4-il)carbonil]piperidin-4-ol, N-(3-metilbencil)-N'-[[1-(piridin-2-ilmetil)pirrolidin-3-il]metil]urea, 5-acetil-N-(2-metilbencil)-N-(tetrahidrofuran-2-ilmetil)-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]pirazina-2-carboxamida y 3-[(2,2-dimetilpropanoil)amino]-2-metil-N-[(1-metilpiperidin-3-il)metil]benzamida; y

(d) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en: la SEQ ID NO. 1, la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3, la SEC ID NO. 4, la SEQ ID NO. 5, la SEQ ID NO. 6 o la SEQ ID NO. 7 y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido.

25 11. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un paciente, preferentemente, en el que el paciente padece una neoplasia maligna, preferentemente, una neoplasia maligna hematopoyética, preferentemente, dicho liposoma o la composición comprenden un agente terapéutico, preferentemente dicho agente terapéutico es uno cualquiera de:

(a) una molécula pequeña que se selecciona del grupo que consiste en 8-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)-1-isobutil-3-(4-metoxibencil)-1,3,8-triazaespiro[4.5]decano-2,4-diona; 2'-metoxi-N-(1-metil-2-piridin-2-iletíl)bifenil-3-carboxamida y 4-{3-[(3-isopropil-1,4,6,7-tetrahidro-5H-pirazolo[4,3-c]piridin-5-il)carbonil]fenil}-2-metilbut-3-in-2-ol; y

(b) ARNip, ARNhc o ARNmi, y en el que el ARNip comprende un oligonucleótido que presenta la secuencia de la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 1, la SEQ ID NO. 2, la SEQ ID NO. 3, la SEQ ID NO. 4, la SEQ ID NO. 5, o la SEQ ID NO. 7 o cualquier mezcla de estas y una cadena complementaria que se relaciona con el oligonucleótido.

40 12. Un liposoma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un paciente, preferentemente, en el que el paciente padece síndrome de Wiskott-Aldrich o trombocitopenia ligada a X, preferentemente, dicho liposoma o composición comprende un agente terapéutico, preferentemente, dicho agente terapéutico es uno cualquiera de:

(a) N-[(2R,4R,6S)-2-(4-clorofenil)-6-(1-metil-1H-1,2,3-benzotriazol-5-il)tetrahidro-2H-piran-4-il]acetamida; 4-[1-({6-[3-(metoximetil)pirrolidin-1-il]piridin-3-il}carbonil)piperidin-4-il] morfolina y 3,5-dimetil-1-(1-
15 {5-(fenoximetil)-1H-pirazol-3-il}carbonil)pirrolidin-3-il)-1H-pirazol; y

(b) un péptido que comprende las SEQ. ID NO. 13, 14 o 15.

45 13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad en un paciente.

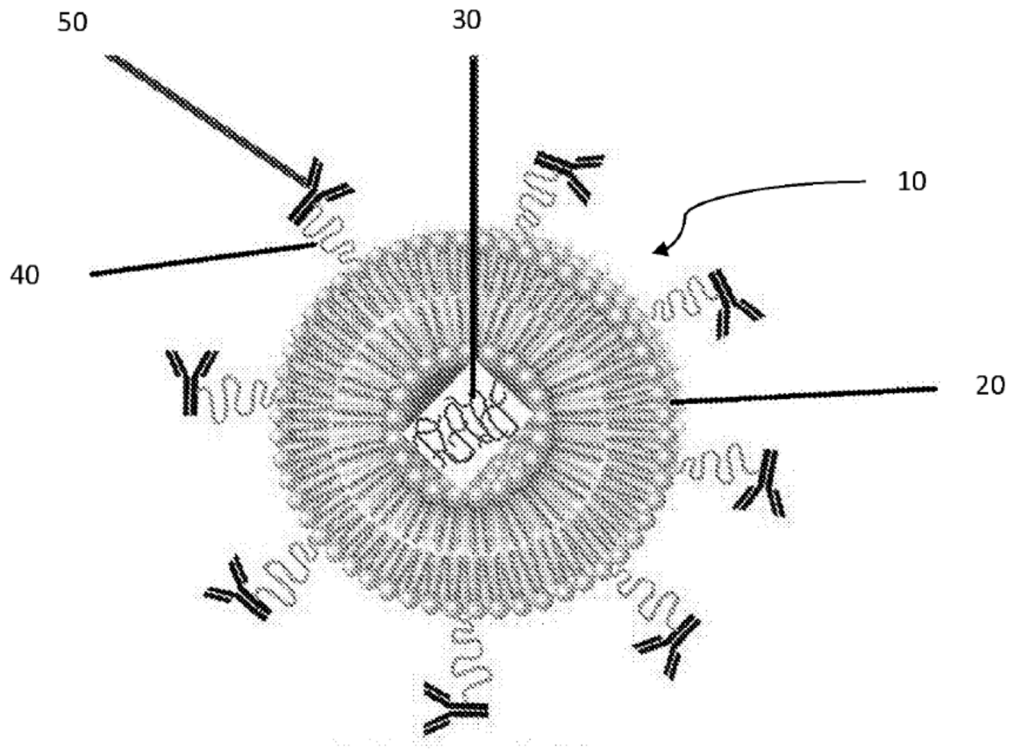


Fig. 1

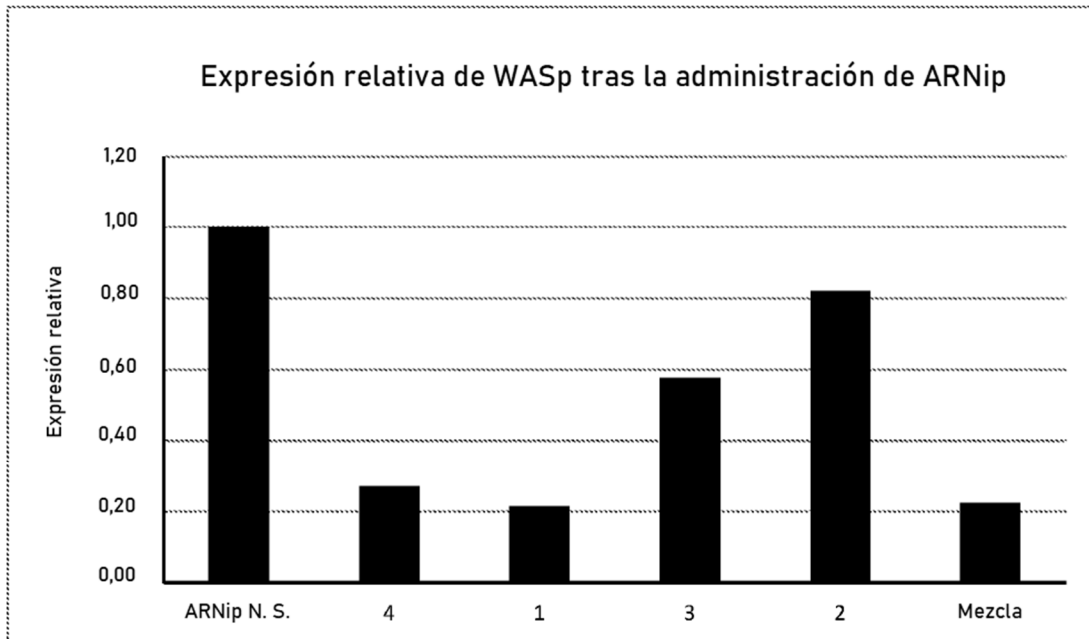


Fig. 2