(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 973 098**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/708 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2016 PCT/EP2016/055659**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146669**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2016 E 16710724 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3270889**

(54) Título: **Administración liposomal dirigida de análogos de CGMP**

(30) Prioridad:

16.03.2015 EP 15159285

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2024

(73) Titular/es:

MIRECA MEDICINES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Straße 5
72076 Tübingen, DE

(72) Inventor/es:

EKSTRÖM, PER;
PAQUET-DURAND, FRANÇOIS;
GAILLARD, PIETER JAAP;
MARIGO, VALERIA;
GENIESER, HANS-GOTTFRIED;
RENTSCH, ANDREAS;
TRIFUNOVIC, DRAGANA y
SAHABOGLU TEKGOZ, AYSE

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Administración liposomal dirigida de análogos de CGMP

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la farmacia. En particular, la invención se refiere al campo de la administración dirigida de fármacos. La invención se refiere a conjugados de ingredientes farmacéuticos activos, comprendidos en nanocontenedores, opcionalmente unidos con ligandos para transportadores de glutatión que median específicamente una unión mejorada, endo- o transcitosis hacia y a través de la barrera hemato-ocular. Estos conjugados se utilizan preferiblemente en métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades de la retina.

Antecedentes de la invención

[0002] Retinosis pigmentaria (RP) es un grupo de enfermedades neurodegenerativas hereditarias gravemente incapacitantes. Normalmente, las células fotorreceptoras de bastones, que permiten la visión en condiciones de poca luz, se degeneran primero durante el curso de la enfermedad. Posteriormente, la pérdida de los bastones desencadena una degeneración secundaria de células fotorreceptoras de conos, la fuente de la visión del color de alta resolución durante el día, lo que eventualmente conduce a la ceguera total.

[0003] La retinosis pigmentaria es causada por un conjunto amplio y dispar de mutaciones, identificadas actualmente en más de 70 genes (véase la Red de información de la retina: https://sph.uth.edu/retnet). Aunque se han definido muchas de las mutaciones causantes, todavía hay muy poca información sobre los mecanismos de degeneración posteriores. Los detalles que conocemos hasta ahora provienen principalmente de estudios en modelos animales (generalmente basados en roedores), que muestran mutaciones genéticas homólogas a cohortes de pacientes humanos con retinosis pigmentaria.

[0004] Los genes mutados en la retinosis pigmentaria suelen estar asociados a la función de los fotorreceptores, pero también los hay que se relacionan con funciones celulares generales (Kennan *et al.* 2005, Trends Genet. 21, 103-110). La molécula cGMP (monofosfato de guanosina cíclico) desempeña un papel directo en la cascada de fototransducción que tiene lugar dentro de las células fotorreceptoras cuando éstas reciben la luz. En muchos casos, las mutaciones de la retinosis pigmentaria conducen a una acumulación excesiva de cGMP en los fotorreceptores (Arango-González *et al.* 2014 PLoS One. 9, e112142), por ejemplo, en situaciones en las que se ven afectados los genes de las enzimas implicadas en el metabolismo cGMP fotorreceptor. Este es el caso de las mutaciones en la fosfodiesterasa 6 (cuyas subunidades están codificadas por los genes *PDE6B, PDE6A, PDE6G* y *PDE6C*, *PDE6H* para fotorreceptores de cono) las enzimas fotorreceptoras que hidrolizan cGMP a GMP. El gen *Pde6b* está mutado en el modelo de ratón *rd1* de retinosis pigmentaria, que ha sido bien estudiado en muchos laboratorios. En una supuesta cadena de acontecimientos, la acumulación de cGMP en la retina mutante PDE6B se produce como consecuencia directa del defecto genético real y, por tanto, esto puede verse como un componente de degeneración temprano y mecanísticamente fundamental. En los próximos pasos, se puede prever que el aumento de cGMP tenga al menos uno de cuatro objetivos: 1) proteína quinasa dependiente de cGMP (proteína quinasa G; PKG), que cuando se activa por cGMP, fosforila proteínas específicas, 2) canales iónicos controlados por nucleótidos cíclicos (CNGC), que, cuando se activan por cGMP, permiten una entrada de Na^+ y Ca^{2+} controlada por cGMP, 3) fosfodiesterasa (PDE) y 4) canal cíclico controlado por nucleótidos (HCN) activado por hiperpolarización. Los dos primeros objetivos cGMP están directamente relacionados con la degeneración de los fotorreceptores (Paquet-Durand *et al.* 2009, J. Neurochem. 108, 796-810; Paquet-Durand *et al.* 2011, Hum. Mol. Genet. 20, 941-947), mientras que los demás son objetivos cGMP conocidos y, por lo tanto, potencialmente involucrados en el proceso degenerativo. Debido a su conexión directa con los primeros eventos, PKG y CNGC pueden considerarse como impulsores de enfermedades, aunque los mecanismos posteriores aún no se comprenden con gran detalle (Trifunovic *et al.* 2012, Curr. Mol. Med. 12, 598-612).

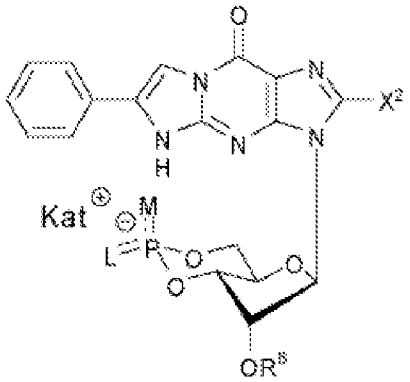
[0005] Hay una variedad de enfoques de tratamiento experimentales para la retinosis pigmentaria que se están investigando actualmente y que se encuentran en diferentes etapas de desarrollo, incluyendo por ejemplo la terapia génica, la investigación con células madre y la optogenética. Sin embargo, actualmente no existe ningún tratamiento clínicamente aprobado disponible. Finley *et al.* (DOI: 10.1016/0304-4165(83)90265-9) describe liposomas que contienen cGMP como agente activo. La patente estadounidense US8524274 describe liposomas que contienen sildenafilo como agente activo. La patente WO 2010/095940 describe sistemas portadores.

[0006] Anteriormente, ciertos inhibidores de PKG derivados de cGMP, por ejemplo Rp-8-Br-cGMPS, ofrecieron cierta protección de modelos de retinosis pigmentaria de ratón fotorreceptores *rd1* y *rd2* tanto *in vitro* como *in vivo* (Paquet-Durand *et al.*, 2009). Sin embargo, estos inhibidores de PKG requerirían una readministración frecuente (es decir, cada dos días) del inhibidor de PKG mediante inyección subtenoniana o intravítrea, lo cual no es práctico para una enfermedad crónica.

[0007] Actualmente no existen métodos aprobados de prevención o tratamiento disponibles para la retinosis pigmentaria. Por lo tanto, todavía existe una necesidad, en la técnica, de tratamientos adecuados para la retinosis pigmentaria, en particular tratamientos con un modo de administración más conveniente. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos medios y métodos para tratar y prevenir la retinosis pigmentaria.

Sumario de la invención

[0008] En un primer aspecto, la invención se refiere a un nanocontenedor farmacéuticamente aceptable que comprende un agente terapéutico para tratar una patología, condición o trastorno asociado con la desregulación de la diana celular afectada por cGMP, donde el agente terapéutico es un análogo de guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico según la fórmula II:



donde

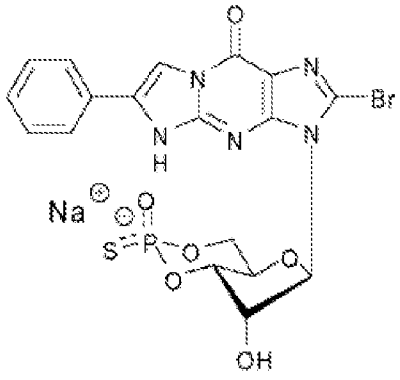
X^2 es hidrógeno, -F, -Cl, -Br, -I, CF_3 o un grupo $-NR^9R^{10}$ o $-SR^{11}$, donde R^9 es hidrógeno y ambos R^{10} y R^{11} son grupos alquilo con un grupo terminal NH_2 u OH,

R^8 es hidrógeno, un grupo (tri)alquilsililo o un grupo acilo, y donde

L es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y M es O(H), o

L es O(H), y M es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y

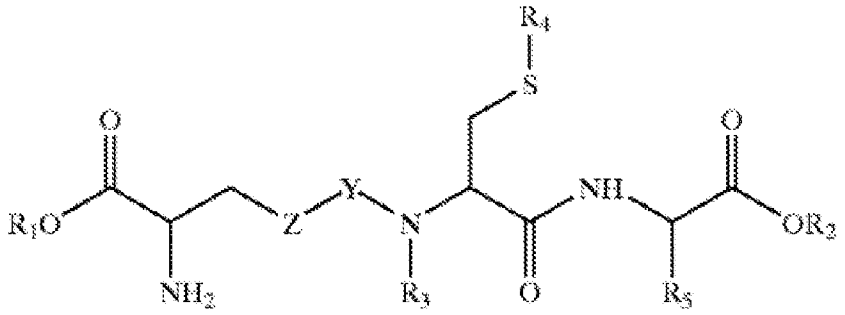
Kat^+ es un protón u otro catión metálico fisiológicamente aceptable o un ion trialquilamonio. Preferiblemente, el nanocontenedor está conjugado con un ligando para un transportador de glutatión. Se prefieren particularmente los análogos cíclicos de guanosina-3', 5'-monofosfato de fórmula III:



u otras sales farmacéuticamente aceptables de los análogos de fórmulas III que sus sales de sodio.

[0009] En un nanocontenedor según la invención, el ligando para un transportador de glutatión es preferiblemente un ligando seleccionado del grupo que consiste en: glutatión, S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico reducido de glutatión, ácido glutatiónsulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-

nitrobencil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, etanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, hexanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, octanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, dodecanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, éster monoisopropílico de GSH (N-(N-L-glutamil-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidrato) y derivados de glutatión de la fórmula V:



donde Z = CH_2 e Y = CH_2, o Z = O e Y = C=O;

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (1-25C), aralquilo (6-26C), cicloalquilo (6-25C), heterociclos (6-20C), éteres o poliéteres (3-25C), y donde R_1-R_2 juntos tienen 2-20 átomos de C y forman un macrociclo con el resto de la fórmula VI;

R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y CH_3;

R_4 se selecciona del grupo que consiste en 6-8C alquilo, bencilo, naftilo y guanosina-3',5'-monofosforotioato cíclico terapéuticamente activo; y,

R_5 se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH_3- y CH_2-fenilo; o,
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0010] Un nanocontenedor preferido según la invención es un liposoma que encapsula el agente terapéutico, donde preferiblemente el ligando para un transportador de glutatión se conjuga con el liposoma a través de un agente de conjugación bifuncional que comprende un derivado de vitamina E o un fosfolípido unido a un extremo del agente de conjugación y el ligando para un transportador de glutatión unido al otro extremo del agente de conjugación, donde más preferiblemente, el agente de conjugación es polietilenglicol que tiene un número de polimerización (n) de entre aproximadamente 6-210, y donde más preferiblemente el polietilenglicol tiene un peso molecular entre 1 000 y 5 000 Da. Se prefiere particularmente un agente de conjugación que se pueda obtener haciendo reaccionar distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol-maleimida (DSPE-PEG-MAL) con un ligando para un receptor de glutatión que tiene un grupo tiol reactivo con maleimida y donde preferiblemente el DSPE-PEG-MAL tiene un peso molecular de alrededor de 2 000 Da. Un ligando preferido para un receptor de glutatión es el glutatión.

[0011] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un nanocontenedor según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0012] En un tercer aspecto, la invención se refiere a un nanocontenedor según la invención, o una composición farmacéutica que comprende dicho nanocontenedor, para su uso como medicamento.

[0013] En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un nanocontenedor según la invención, o una composición farmacéutica que comprende dicho nanocontenedor, para usar en el tratamiento de una patología, afección o trastorno asociado con la desregulación de la diana celular afectada por cGMP, donde preferiblemente el objetivo es al menos uno de entre una proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), un canal cíclico controlado por nucleótidos (HCN) activado por hiperpolarización, una fosfodiesterasa (PDE) y un canal controlado por cGMP. Preferiblemente, el nanocontenedor o composición se usa en el tratamiento de al menos uno de: a) retinosis pigmentaria u otra enfermedad hereditaria de la retina; b) degeneración pigmentaria secundaria de la retina como resultado de una enfermedad metabólica o neurodegenerativa, un síndrome o una enfermedad ocular; c) enfermedades de la retina que comprenden retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, agujero/pucker macular, neoplasias malignas oculares, retinoblastoma, desprendimiento de retina y ceguera de los ríos; y, d) trastornos neuronales o neurodegenerativos, anosmia, dolor inflamatorio y neuropático, recrecimiento axonal y recuperación después de una lesión de la médula espinal e) enfermedades parasitarias tales como malaria, tripanosomiasis africana y enfermedad de Chagas; y, f) enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipotensión, angina de pecho, hipertensión pulmonar, disfunción eréctil, ictus isquémico, aterosclerosis, cáncer o shock agudo.

[0014] Preferiblemente, el nanocontenedor o la composición farmacéutica que comprende el nanocontenedor para un uso como medicamento o para un uso como tratamiento según la invención se administra de manera sistémica o local, donde preferiblemente el nanocontenedor o la composición farmacéutica que comprende el nanocontenedor se administra por al menos una de las siguientes vías: a) inyección o infusión, por al menos una de las siguientes vías: intravítrea, intravenosa, intraperitoneal e intraarterial, y b) aplicación tópica u ocular.

[0015] El nanocontenedor se administra preferiblemente en dosis de entre 0,1 y 1000 mg/kg una vez cada 1 o 2 días. Alternativamente, para enfermedades oculares, los nanocontenedores se pueden inyectar por vía intravítrea, con o sin un ligando de objetivo conjugado a los mismos, una vez cada dos semanas o una vez cada seis semanas.

Descripción de la invención

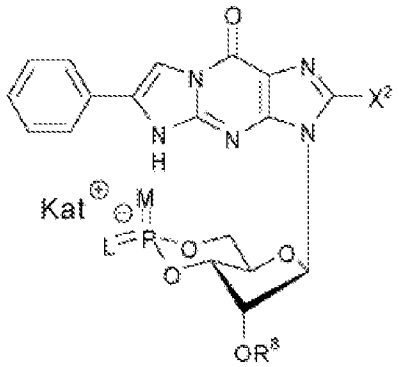
[0016] En un primer aspecto, la invención se refiere a nanocontenedores para dirigir agentes terapéuticamente activos hacia y a través de la barrera hemato-ocular. Preferiblemente, los nanocontenedores de la invención comprenden un agente terapéutico para tratar una patología, afección o trastorno asociado con la desregulación de una diana celular afectada por cGMP, donde preferiblemente la diana es al menos uno de entre una proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), un canal cíclico controlado por nucleótidos (HCN) activado por hiperpolarización, una fosfodiesterasa (PDE) y un canal controlado por cGMP (CNGC). El agente terapéutico puede ser una pequeña molécula orgánica, una proteína, por ejemplo una enzima o un anticuerpo, o un ácido nucleico como por ejemplo un vector de terapia génica. El agente terapéutico que debe estar comprendido en un nanocontenedor según la invención es un análogo de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico según la fórmula II como se describe más adelante en el presente documento.

[0017] En una forma de realización preferida, un nanocontenedor según la invención se conjuga con un ligando para un transportador de glutatión.

[0018] Un "conjugado" se define en el presente documento como que consta de dos entidades que están acopladas entre sí. Preferiblemente, las dos entidades se conjugan mediante interacción proteína-proteína no específica o específica, mediante enlace covalente, mediante enlace no covalente, mediante enlace químico coordinante y/o mediante interacciones hidrófobas. En el contexto de la presente invención, la primera entidad puede ser un portador farmacéuticamente aceptable que comprende un agente terapéutico como se define a continuación en el presente documento, mientras que la segunda entidad normalmente será un ligando para un receptor en una célula diana como se define a continuación en el presente documento.

Análogos cíclicos de guanosina-3', 5'-monofosfato

[0019] Los análogos cíclicos de guanosina-3',5'-monofosfato (cGMP) que están comprendidos en los nanocontenedores de la invención son de fórmula II:



donde

X^2 es hidrógeno, -F, -Cl, -Br, -I, CF_3 o un grupo $-NR^9R^{10}$ o $-SR^{11}$, donde R^9 es hidrógeno y ambos R^{10} y R^{11} son grupos alquilo con un grupo terminal NH_2 u OH,
R^8 es hidrógeno, un grupo (tri)alquilsililo o un grupo acilo, y donde
L es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y
M es O(H), o
L es O(H), y

M es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y
Kat^+ es un protón u otro catión metálico fisiológicamente aceptable o un ion trialquilamonio.

[0020] Se prefieren los compuestos cíclicos de guanosina-3',5'-monofosfato según la fórmula I que tienen sustituyentes aromáticos hidrófobos en la posición 8.

[0021] También se prefieren estructuras según la fórmula II, que llevan halógenos en la posición 8 de la nucleobase.

[0022] Los cationes metálicos preferidos son Na^+, K^+, Li^+, Ca^{2+} y Mg^{2+}.

[0023] Los compuestos cíclicos de guanosina-3',5'-monofosfato pueden modificarse adicionalmente como se describe en la patente estadounidense US 5,625,056.

[0024] Además, los guanosina-3',5'-monofosfatos cíclicos para los nanocontenedores de la invención se pueden obtener como se describe en los documentos US 5,625,056, WO 2012/130829, Sekhar *et al.* (1992, Mol. Pharmacol., 42: 103 - 108) y Miller *et al.* (1973, Biochemistry 12: 5310 - 5319).

[0025] Si el residuo ecuatorial L es azufre, el correspondiente compuesto de guanosina-3',5'-monofosforotioato cíclico (cGMPS) tiene configuración Rp en fósforo, si el residuo ecuatorial L es un grupo borano, el correspondiente compuesto guanosina-3', 5'-monoboranofosfato cíclico (cGMPB) tiene configuración Sp en fósforo.

[0026] Si el residuo axial M es azufre, el correspondiente compuesto de guanosina-3',5'-monofosforotioato cíclico tiene configuración Sp en fósforo, si el residuo axial M es un grupo borano, el correspondiente compuesto de guanosina-3',5'-monoboranofosfato cíclico tiene configuración Rp en fósforo.

[0027] Los guanosina-3',5'-monofosfatos cíclicos, incluidos los compuestos cGMPS configurados con Sp y los compuestos cGMPB configurados con Rp según la invención, se consideran activadores de las isoenzimas de la proteína quinasa G, así como de canales iónicos controlados por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.

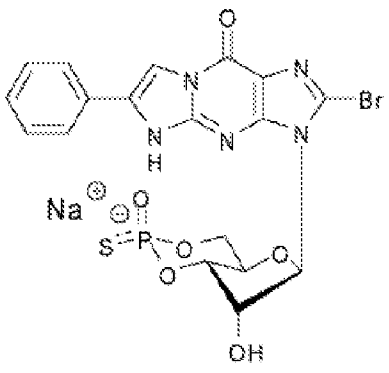
[0028] Los compuestos cGMPS configurados con Rp y los compuestos cGMPB configurados con Sp según la invención se consideran inhibidores de las isoenzimas de la proteína quinasa G y activadores de los canales iónicos controlados por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.

[0029] Según la invención, los compuestos según la fórmula II se consideran inhibidores de los canales iónicos controlados por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.

[0030] Según la invención, los compuestos cGMPS configurados con Sp según la fórmula II y los compuestos cGMPB configurados con Rp según la fórmula II se consideran activadores de las isoenzimas de la proteína quinasa G, a la vez que son inhibidores de canales iónicos controlados por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.

[0031] Según la invención, los compuestos cGMPS configurados con Rp según la fórmula II y los compuestos cGMPB configurados con Sp según la fórmula II se consideran inhibidores tanto de las isoenzimas de la proteína quinasa G como de los canales iónicos controlados por guanosina-3', 5'-monofosfato cíclico.

[0032] En un nanocontenedor preferido de la invención, el guanosina-3', 5'-monofosforotioato cíclico tiene configuración Rp y tiene la fórmula III:



donde el catión sodio puede ser cualquier otro catión farmacéuticamente aceptable, por ejemplo un protón u otro catión metálico fisiológicamente aceptable o un ion trialquilamonio. La Fórmula III también ejemplifica un compuesto con una modificación "β-fenil-1,N^2-eteno" (PET).

[0033] Este guanosina-3',5'-monofosforotioato cíclico preferido también tiene un nombre científico abreviado como Rp-8-Br-PET-cGMPS o como DF003 en los ejemplos del presente documento. Su nombre científico completo, computado según la nomenclatura IUPAC, es: Sodio, 3-[(4aR,6R,7R,7aS)-7-hidroxi-2-oxido-2-sulfanilideno-4a,6,7,7a-tetrahidro-4H-furo[3,2-d][1,3,2]dioxafosfinin-6-il]-2-bromo-6-fenil-5H-imidazo[1,2-a]purin-9-ona. Rp-8-Br-PET-cGMPS está disponible comercialmente en BIOLOG Life Science Institute GmbH, Bremen, Alemania (Cat. No.: P 007 No. CAS: [172806-20-1]). En una forma de realización preferida donde Rp-8-Br-PET-cGMPS se encapsula en liposomas mediante carga remota, se prefiere Ca^{2+} como contra catión en el interior del liposoma (véase más adelante).

[0034] Según la invención, los nanocontenedores están cargados con compuestos de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico.

[0035] La selección de un compuesto de las formas de realización preferidas se rige por la(s) proteína(s) de unión diana que se modularán:

si la tarea es la activación de una proteína quinasa dependiente de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, según la invención, la carga preferida del nanocontenedor es un compuesto de cGMP sin ninguna modificación en el fósforo o un compuesto de cGMPS configurado con Sp o un compuesto cGMPB configurado con Rp.

[0036] Si la tarea biológica es la inhibición de una proteína quinasa dependiente de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, según la invención la carga preferida del nanocontenedor es un compuesto cGMPS configurado con Rp o un compuesto cGMPB configurado con Sp.

[0037] Si la tarea es la activación de un canal iónico controlado por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, según la invención, la carga preferida del nanocontenedor es un compuesto de cGMP o un compuesto de cGMPS o un compuesto de cGMPB sin ninguna modificación de PET.

[0038] Si la tarea según la invención es la activación simultánea de una proteína quinasa dependiente de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico y un canal iónico controlado por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, la carga preferida del nanocontenedor es un compuesto cGMP o un compuesto cGMPS configurado con Sp o un compuesto cGMPB configurado con Rp sin ninguna modificación de PET.

[0039] Si la tarea según la invención es la inhibición simultánea de una proteína quinasa dependiente de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico y un canal iónico controlado por guanosina-3',5'-monofosfato cíclico, la carga preferida del nanocontenedor es un compuesto cGMPS configurado con Rp con modificación de PET o un compuesto cGMPB configurado con Sp con modificación de PET.

[0040] Otros ejemplos de activación de análogos de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico incluyen 8-bromoguanosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-cGMP), 8-bromo-β-fenil-1,N^2-etenoguanosina- 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-PET-cGMP), 8-bromo-(2-naftil-1,N2-eteno)guanosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-(2-N)ET-cGMP), 2-naftil-1,N2-etenoguanosina- 3',5'-monofosfato cíclico ((2-N)ET-cGMP), β-fenil-1,N^2-etenoguanosina- 3',5'-monofosfato cíclico (PET-cGMP), 4-metoxi-β-fenil-1,N^2-etenoguanosina-3',5'-monofosfato (pMeO-PET-cGMP), y sus sales farmacéuticamente aceptables, donde el catión puede ser cualquier catión metálico fisiológicamente aceptable o un ión de trialquilamonio, por ejemplo una sal de sodio o calcio.

Ligandos dirigidos a un transportador de glutatión

[0041] Un nanocontenedor según la invención comprende un ligando para un transportador de glutatión (GSH) para dirigir el nanocontenedor hacia, dentro de y/o a través de células que expresan el transportador. Por lo tanto, preferiblemente el transportador de GSH media al menos uno de entre unión específica, endocitosis y transcitosis del ligando y el nanocontenedor que comprende el ligando dentro y/o a través de una célula diana que expresa el transportador. La administración mediada por transportador o receptor es una posible técnica de administración dirigida de fármacos que se ha desarrollado en los últimos años. Tiene la ventaja potencial de una alta especificidad de administración a células diana que expresan un receptor/transportador para el ligando que está conjugado con un fármaco o un portador de fármaco. El direccionamiento específico de agentes terapéuticos basados en polipéptidos y ácidos nucleicos de bajo peso molecular, y nanocontenedores que comprenden estos agentes, a células y tejidos puede mejorarse en gran medida mediante el uso de administración mediada por transportador/receptor.

[0042] En una forma de realización, el ligando en los nanocontenedores de la invención es un ligando para un transportador de GSH que se expresa en células endoteliales de una barrera hematotisular, que incluye, por ejemplo, la barrera hemato-ocular, una barrera creada por el endotelio de los capilares de la retina y el iris, el

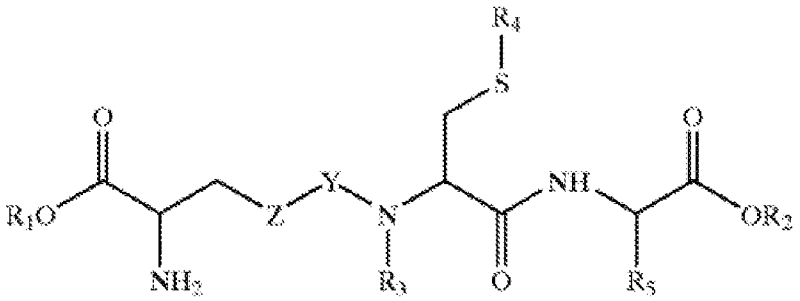
epitelio ciliar y el epitelio pigmentario retinal (EPR). Consta de los siguientes componentes: barrera hematoacuosa: el epitelio ciliar y capilares del iris, y barrera hemato retiniana (BRB): capilares no fenestrados de la circulación retiniana y uniones estrechas entre las células epiteliales pigmentarias de la retina que impiden el paso de moléculas grandes desde la coriocapilar hasta la retina, la barrera hematotesticular, la barrera hematoplacentaria y la barrera hemato-SNC, como por ejemplo la barrera hematoencefálica, la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR), la barrera vaso pial-CSF, epéndimo y glía limitans, la barrera hematonerviosa y la barrera hematomedular. Un ligando preferido es un ligando para un transportador de GSH que se expresa en células endoteliales de la barrera hemato retiniana. El uso de dichos ligandos permitirá la administración específica, o la administración específicamente mejorada, de dichos agentes dirigidos a la retina para el tratamiento de enfermedades de la retina. La focalización mediada por receptores se puede combinar además con sistemas de administración de fármacos no específicos (como conjugados de proteínas, PEGilación, nanopartículas, liposomas y similares) para mejorar en gran medida las propiedades farmacocinéticas y de biodistribución de los fármacos, lo que redirigirá significativamente los fármacos específicamente a células, tejidos y órganos que expresan receptores, incluidos los protegidos por barreras hematotisulares específicas como por ejemplo la retina, el SNC, la barrera hematoencefálica (BHE), la placenta y los testículos.

[0043] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el ligando que se va a incorporar en los nanocontenedores de la invención es un ligando para un transportador de GSH endógeno en una célula diana. El ligando es preferiblemente un ligando para un transportador de GSH de una célula diana de vertebrado, más preferiblemente un transportador de GSH de una célula diana de mamífero y de la manera más preferible un transportador de GSH de una célula diana humana. El ligando es preferiblemente un ligando que se une específicamente al transportador de GSH. Más preferiblemente, el ligando se une específicamente al transportador GSH dependiente de Na tal como está presente en las células endoteliales cerebrovasculares humanas como se describe en Kannan *et al.* (2000, Brain Res. 852(2):374-82). El término "unión específica", por ejemplo, de un ligando a un transportador, como se usa en el presente documento, significa una unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula (ligando) en comparación con la unión de una molécula de control (ligando de control), que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión, por ejemplo, un péptido de tamaño similar que carece de una secuencia de unión específica. La unión específica está presente si un ligando tiene una afinidad considerablemente mayor por el receptor que la que tiene el ligando de control. La especificidad de la unión se puede determinar, por ejemplo, mediante competencia con un ligando de control que se sabe que se une a un objetivo. El término "unión específica", como se usa en el presente documento, incluye unión específica de alta y baja afinidad. Se puede exhibir unión específica, por ejemplo, por un agente de dirección de baja afinidad que tiene una Kd de al menos aproximadamente 10^{-4} M. Por ejemplo, si un receptor tiene más de un sitio de unión para un ligando, un ligando que tenga baja afinidad puede ser útil para dirigirse al endotelio microvascular. La unión específica también puede exhibirse mediante un ligando de alta afinidad, por ejemplo, un ligando que tiene una Kd de al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos alrededor de 10^{-8} M, al menos alrededor de 10^{-9} M, al menos alrededor de 10^{-10} M, o puede tener una Kd de al menos aproximadamente 10^{-11} M o 10^{-12} M o mayor. Tanto los ligandos de direccionamiento de baja como de alta afinidad son útiles para su incorporación en los nanocontenedores de la presente invención.

[0044] La unión específica de un ligando a un transportador es preferiblemente como se define anteriormente en el presente documento. En otra forma de realización, el ligando es un ligando que se endocitosis y/o se transcitosa dentro y/o a través de la célula diana como se puede analizar mediante un modelo de cultivo celular de la BBB (usando células endoteliales capilares de cerebro bovino aisladas primarias (BCEC)) como se describe en Gaillard *et al.* (2001, Eur J Pharm Sci. 12(3): 215-222.), o del BRB (utilizando células endoteliales capilares de retina bovina aisladas primarias (BREC)) como se describe en Wisniewska-Kruk *et al.* (2012, Exp Eye Res. 96(1): 181-90)), o modelos similares que utilizan, por ejemplo, línea celular endotelial capilar cerebral humana (hCMEC/D3), células RBE4 o células MDCK como células diana. Un ligando que se endocitosis y/o se transcitosa dentro y/o a través de la célula diana se define en el presente documento como un ligando que se endocitosis o se transcitosa dentro o a través de una célula diana BCEC o MDCK a una velocidad que esté al menos un 5, 10, 20 o 50 % mejorada en comparación con las condiciones de control seleccionadas de a) células que carecen de expresión de transportadores de GSH; b) células pretratadas con exceso de GSH libre; y c) un compuesto de referencia que carece de una fracción de GSH; cuando se mide a 15, 30 o 60 minutos o 1, 2, 4, 8 o 18 horas o menos después de la adición del ligando a la célula diana. Alternativamente, la endocitosis y/o transcitosis de ligandos dirigidos al transportador de GSH se pueden analizar mediante técnicas de bioimagen *in vivo* que utilizan, por ejemplo, tintes de infrarrojo cercano o marcadores radiactivos conjugados con ellos, lo que da como resultado una retención mejorada de al menos un 10, 20 o 50 % en el área del SNC del ligando en puntos temporales determinados (según la cuantificación de píxeles de la región de interés (ROI)), en comparación con las condiciones de control apropiadas (por ejemplo, comparación con compuestos de referencia que carecen de fracciones de GSH).

[0045] Los ligandos preferidos que se unen al transportador de GSH, para su uso de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo, ligandos seleccionados del grupo que consiste en: glutatión (GSH o gamma-glutamilcisteinilglicina), S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico reducido de glutatión, ácido glutatiónsulfónico, S-

hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobencil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamilcisteinilglicina (también conocido por la abreviatura GSH-C4) o sus derivados etanoil, hexanoil, octanoil o dodecanoil (también conocidos por las abreviaturas GSH-C2, GSH-C6, GSH-C8 y GSH-C12, respectivamente), éster monoisopropílico de GSH (también conocido como monohidrato de sulfato de éster 1-isopropil de N-(N-L-glutamil-L-cisteinil)glicina o YM737), y derivados de GSH como se describe en la patente estadounidense Nº 6,747,009 de la fórmula V:



donde Z = CH_2 e Y = CH_2, o Z = O e Y = C=O;
R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (1-25C), aralquilo (6-26C), cicloalquilo (6-25C), heterociclos (6-20C), éteres o poliéteres (3-25C), y donde R_1-R_2 juntos tienen 2-20 átomos de C y forman un macrociclo con el resto de la fórmula I; R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y CH_3;
R_4 se selecciona del grupo que consiste en 6-8C alquilo, bencilo, naftilo y un compuesto terapéuticamente activo; y,
R_5 se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH_3- y CH_2-fenilo; o,
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0046] En una forma de realización preferida R_3 en la fórmula anterior es H. En otra forma de realización preferida R_4 en la fórmula IV anterior es bencilo. En otra forma de realización preferida R_5 en la fórmula IV anterior es fenilo.

[0047] En una forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o sintetiza a través del residuo de aminoácido N-terminal, es decir, el grupo amino del residuo de ácido glutámico.

[0048] En otra forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o sintetiza a través del residuo de aminoácido C-terminal, es decir, el grupo carboxilo del residuo de glicina.

[0049] En otra forma de realización preferida de la invención, el ligando se conjuga o se sintetiza mediante el grupo tiol (SH) de la fracción de cisteína.

Nanocontenedores

[0050] Los ligandos en los nanocontenedores de la invención están preferiblemente conjugados con nanocontenedores farmacéuticamente aceptables que comprenden un agente terapéutico. En tales conjugados, el agente terapéutico puede, por ejemplo encapsularse dentro de nanocontenedores, tales como nanopartículas, liposomas o nanogeles, por lo que el ligando está preferiblemente conjugado y acoplado a dicho nanocontenedor. Dicha conjugación con el nanocontenedor puede realizarse directamente o mediante cualquiera de los agentes de conjugación poliméricos conocidos, como esfingomielina, polietilenglicol (PEG) u otros polímeros orgánicos. Para nanocontenedores inyectados intravítreamente, también se pueden usar nanocontenedores sin un ligando conjugado con los mismos. Los detalles de la producción de tales composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas dirigidos (PEG) se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense US 6,372,250. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un nanocontenedor según la invención es al menos uno de una proteína portadora, un liposoma, un sistema poliplex, un sistema lipoplex y polietilenglicol.

[0051] Un nanocontenedor preferido para encapsular el agente terapéutico y conjugarlo con el ligando de acuerdo con la invención es un liposoma. Los liposomas adecuados para su uso en los nanocontenedores de la invención incluyen aquellos compuestos principalmente de lípidos formadores de vesículas. Los lípidos formadores de vesículas, ejemplificados por los fosfolípidos, se forman espontáneamente en vesículas bicapa en agua a pH y temperaturas fisiológicas. Los liposomas también pueden incluir otros lípidos, incorporados en las bicapas lipídicas, con la fracción hidrófoba en contacto con la región hidrófoba interior de la membrana bicapa, y la fracción del grupo de cabeza orientada hacia la superficie polar exterior de la membrana bicapa. Los lípidos formadores de vesículas son preferiblemente aquellos que tienen dos cadenas de hidrocarburos, típicamente

cadenas de acilo, y un grupo de cabeza, ya sea polar o no polar. Hay una variedad de lípidos formadores de vesículas diacil sintéticos y lípidos formadores de vesículas de origen natural, tales como fosfolípidos, diglicéridos, glicolípidos dialifáticos, lípidos individuales tales como esfingomielina y glicoesfingolípido, colesterol y derivados de los mismos, solos o en combinaciones y/o con o sin agentes rigidizadores de la membrana liposomal. Como se define en el presente documento, los "fosfolípidos" incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), esfingomielina, plasmalógenos y derivados lipídicos de fosfatidilcolina donde las dos cadenas de hidrocarburos suelen tener entre 14 y 22 átomos de carbono de longitud y tienen distintos grados de insaturación.

[0052] El uso de lípidos con altas temperaturas de transición y la incorporación de colesterol (CHOL) y conjugados lipídicos como el polietilenglicol distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG), conducen a una disminución significativa de la fuga de los fármacos encapsulados durante la circulación sanguínea o en el medio extracelular. Además, dichos lípidos también reducen las interacciones no específicas entre los liposomas y las proteínas séricas (opsoninas), impidiendo así la eliminación de los liposomas por las células del sistema reticuloendotelial (RES), aumentando el tiempo de circulación para optimizar la interacción del sistema con las células diana (Allen, 1987; Gabizon, 1992). Ejemplos de fosfolípidos que tienen una temperatura de transición de fase de 37°C o superior incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolina de huevo purificada hidrogenada (HEPC; temperatura de transición de fase: 50 - 60°C), fosfatidilcolina de soja purificada hidrogenada (HSPC; temperatura de transición de fase: aproximadamente 55°C), fosfatidilcolina de dipalmitoil (DPPC; temperatura de transición de fase: aproximadamente 41°C), y distearoil fosfatidilcolina (DSPC; temperatura de transición de fase: aproximadamente 58°C). De estos, el HSPC es el más preferido. Estos fosfolípidos se pueden usar solos o en combinación de dos o más tipos. El liposoma usado en la presente invención puede comprender además un agente estabilizante tal como colesterol o un derivado del colesterol. La relación molar entre un derivado de colesterol y un fosfolípido es preferiblemente de 1:0,3 a 3, más preferiblemente de 1:1 a 2,5 y de la manera más preferible de 1:1,2 a 1,8 o aproximadamente 1:1,5.

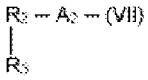
[0053] El tamaño medio del liposoma está preferiblemente entre 50 y 200 nm, más preferiblemente entre 80 y 150 nm y de la manera más preferible entre 100 y 120 nm, con una polidispersidad (PdI) inferior a 0,2, 0,15 o 0,1.

[0054] Los liposomas se pueden cargar con el ingrediente activo mediante dos métodos, carga pasiva y activa (remota). La bicapa lipídica del liposoma es una barrera semipermeable que bloquea la difusión de moléculas cargadas y más grandes sin carga, mientras que las sustancias pequeñas sin carga pueden penetrar libremente. En la carga pasiva, un fármaco impermeable a la membrana se disuelve en la solución de hidratación durante el proceso de fabricación del liposoma. Tras la adición de la solución acuosa a una mezcla de lípidos, se forman bicapas lipídicas y encapsulan parcialmente la solución del fármaco para formar liposomas. La mayor parte de la solución del fármaco permanece en la solución externa y debe eliminarse mediante diálisis o cromatografía. La encapsulación pasiva está limitada por el volumen atrapado en los liposomas y la solubilidad del fármaco. Por tanto, la eficiencia de encapsulación (EE) es menor y normalmente no supera el 5 %. Sin embargo, en principio, cualquier ingrediente activo puede encapsularse mediante carga pasiva. Por lo tanto, se prefiere la carga activa (remota). En carga activa, como por ejemplo se describe en la patente EP0825852, el fármaco se encapsula mediante métodos activos después de la formación de los liposomas, lo que puede dar como resultado eficiencias de captura cercanas al 100 %. Sin embargo, solo los medicamentos que son anfipáticos, ácidos débiles o básicos califican para la carga remota. La encapsulación de estas moléculas se basa en el hecho de que las moléculas ionizadas son menos permeables a la membrana en comparación con sus especies no ionizadas. Por lo tanto, provocar la ionización intraliposomal del fármaco mediante un gradiente de pH provoca el atrapamiento del compuesto, lo que conduce a una alta relación de concentración de intra- a extraliposomal del fármaco. Como se muestra en los Ejemplos del presente documento, Rp-8-Br-PET-cGMPS se puede encapsular eficientemente en liposomas mediante carga activa.

[0055] El ligando se puede conjugar con los nanocontenedores de la invención directamente o mediante cualquier agente de conjugación, preferiblemente un agente de conjugación polimérico. El polietilenglicol (PEG) es un agente de conjugación preferido. El PEG tiene preferiblemente un número de polimerización (n) de aproximadamente 6-210. El peso molecular del agente de conjugación está preferiblemente entre 300 y 50 000 Da, más preferiblemente entre 750 y 10 000 Da, y de la manera más preferible entre 1 000 y 5 000 Da. por ejemplo, alrededor de 2 000 Da.

[0056] Un agente de conjugación preferido es un agente de conjugación bifuncional, que contiene un lípido en un extremo y el ligando para un transportador de GSH en el otro extremo. El extremo lipídico del PEG une el agente de conjugación al liposoma interactuando con y/o insertándose en la bicapa lipídica. El extremo lipídico del agente de conjugación puede comprender un derivado de vitamina E o un fosfolípido. Los derivados de vitamina E preferidos son por ejemplo los descritos en la patente EP05292820. El fosfolípido en el extremo lipídico del agente de conjugación puede tener las siguientes fórmulas:

R_1-A_1- (VI) o



[0057] En la fórmula (VI), A_1 es esfingosina y R_1 puede comprender octanoil o palmitoil. En la fórmula (VII), A_2 es fosfoetanoamina y R_2 y R_3 puede comprender miristoil, palmitoil, estearoil u oleoil, donde R_2 y R_3 pueden ser iguales o diferentes. Cuando el PEG está unido a los derivados de fosfolípidos representados por la fórmula (VI), preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 750 - 5 000 Da, y cuando el PEG está unido a los derivados de fosfolípidos representados por la fórmula (VII), preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 350 -5 000 Da.

[0058] En el extremo opuesto al extremo lipídico, el PEG preferiblemente se derivatiza para que comprenda ácido carboxílico, una maleimida o una amida para unir covalentemente el ligando para un transportador de GSH. Un agente de conjugación preferido se puede obtener haciendo reaccionar 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenglicol-maleimida (DSPE-PEG-MAL) con un ligando para un receptor de GSH que tiene un grupo tiol reactivo a la maleimida. DSPE-PEG-maleimida está disponible comercialmente en pesos moleculares de por ejemplo 1 000, 2 000, 3 400, 5 000, 10 000 y 20 000, de los cuales se prefiere DSPE-PEG(2000)-maleimida.

[0059] Preferiblemente se conjugan de 5 a 1000 agentes de conjugación a cada liposoma. Más preferiblemente, se conjugan aproximadamente al menos 10, 20, 30 o 40 agentes de conjugación y no más de 200, 100 o 50 agentes de conjugación a cada liposoma.

Uso de los nanocontenedores

[0060] En otro aspecto, los nanocontenedores de la invención se utilizan como medicamento.

[0061] Los nanocontenedores de la invención se usan preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de una patología, afección o trastorno asociado con la desregulación de una diana celular afectada por cGMP, donde preferiblemente la diana es al menos uno de entre una proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y un canal controlado por cGMP (CNGC). Schlossmann y Schinner (2012, Arch Pharmacol, 385:243-252) y Wolfertstetter *et al.* (2013, Pharmaceuticals 2013, 6: 269-286) revisan si la inhibición o activación de al menos uno de o ambos PKG y CNGC es la tarea biológica apropiada en el tratamiento de una patología, afección o trastorno particular. De acuerdo con esto, se puede elegir un análogo de cGMP capaz de realizar esta tarea biológica como se establece anteriormente para los diferentes análogos. Debe entenderse en el presente documento que el tratamiento de una patología, afección o trastorno también incluye su prevención, incluso si no se menciona explícitamente, a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0062] Preferiblemente, los nanocontenedores de la invención se usan para tratar o prevenir una enfermedad o afección de la retina. Las enfermedades y afecciones de la retina se tratan preferiblemente con los nanocontenedores de la invención que comprenden un análogo de cGMP que inhiben al menos uno de PKG y CNGC, tal como por ejemplo Rp-8-Br-PET-cGMPS, e incluyen enfermedades hereditarias raras de la retina, como retinosis pigmentaria, enfermedad de Stargardt, fundus flavimaculatus, enfermedad de Best juvenil, distrofia foveomacular viteliforme del adulto (degeneración viteliforme del adulto), drusas familiares (distrofia macular de Carolina del Norte), distrofia cristalina de Bietti, distrofias de conos progresivas, síndrome de Alport, retina moteada familiar benigna, amaurosis congénita de Leber, monocromatismo congénito y distrofias maculares hereditarias.

[0063] Además, estos nanocontenedores de la invención, que comprenden preferiblemente un análogo de cGMP que inhiben al menos uno de PKG y CNGC, como por ejemplo Rp-8-Br-PET-cGMPS puede usarse para tratar la degeneración pigmentaria secundaria de la retina, tal como ocurre en una serie de enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, varios síndromes y otras enfermedades oculares, que incluyen: retinosis pigmentaria y pérdida de audición, también están asociadas con el síndrome de Usher, síndrome de Waardenburg, síndrome de Alström, síndrome de Alport, síndrome de Refsum y otras afecciones sistémicas, todas las cuales tienen sus propias manifestaciones sistémicas, baja estatura, disfunción renal y polidactilia son algunos signos del síndrome de Bardet-Biedl o síndrome de Laurence-Moon cuando se asocian con retinopatía pigmentaria, las mucopolisacaridosis pueden asociarse con retinosis pigmentaria (por ejemplo, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Sanfilippo), así como el de trastorno mitocondrial síndrome de Kearns-Sayre. Además de los mencionados anteriormente, estos incluyen: ataxia de Friedreich, mucopolisacaridosis, distrofia muscular (distrofia miotónica), síndrome de Batten, síndrome de Bassen-Kornzweig, homocistinuria, oxalosis, traumatismo ocular y retiniano, glaucoma con cambios en el epitelio pigmentario de la retina, retinopatía por cloroquina en fase terminal, retinopatía por tioridazina en fase terminal, neurorretinitis sifilítica en fase terminal y retinopatía relacionada con el cáncer. Estos nanocontenedores de la invención también se pueden usar para tratar otras enfermedades comunes de la retina tales como por ejemplo la retinopatía diabética, la degeneración macular

relacionada con la edad, el agujero/pucker macular, neoplasias malignas oculares, como retinoblastoma, desprendimiento de retina y ceguera de los ríos/oncocercosis.

[0064] Además, los nanocontenedores de la invención se pueden usar para tratar afecciones completamente diferentes que están asociadas con la desregulación de al menos una de una proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG) y un canal controlado por cGMP (CNGC), como trastornos neuronales o neurodegenerativos, anosmia, dolor inflamatorio y neuropático, recrecimiento axonal y recuperación después de una lesión de la médula espinal (Henkin *et al.*, 2008, Clin Invest Med. 31 :E78-84; Schmidtko *et al.*, 2008, J Neurosci. 28:8568-76; Ter-Avetisyan *et al.*, 2014, J Neurosci. 34:737-47; Senturk *et al.*, 2014: Br J Neurosurg. 7:1-6). También enfermedades cardiovasculares, hipertensión (activadores de PKG), hipotensión (inhibidores de PKG), angina de pecho, hipertensión pulmonar, disfunción eréctil, ictus isquémico, aterosclerosis, shock agudo y cáncer (véase por ejemplo Wang *et al.*, 2012, J. Cell. Biochem. 113: 3587-3598; Karakhanova *et al.*, 2014, Pancreas, 43:784-794; Francis *et al.*, 2010, Pharmacol Rev. 62:525-63). Esto también incluye ciertas enfermedades parasitarias como la malaria, la enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana) y la enfermedad de Chagas, en las que la supervivencia del parásito depende críticamente de la actividad de la PKG (Taylor *et al.*, 2010, Eukaryot Cell. 9:37-45).

[0065] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir cualquiera de las patologías, afecciones o trastornos anteriores mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de (una composición farmacéutica que comprende) un nanocontenedor de la invención, a un sujeto que necesite profilaxis o terapia.

[0066] El direccionamiento de GSH de los nanocontenedores de la invención hacia y a través de la barrera hemato-ocular permite la administración sistémica de los nanocontenedores y la administración eficiente de los agentes terapéuticos a la retina. Por tanto, los nanocontenedores según la invención se administran preferiblemente por vía sistémica o a través del torrente sanguíneo. Alternativamente, o además, los nanocontenedores de la invención pueden administrarse localmente.

[0067] Preferiblemente los nanocontenedores de la invención se administran por vía parenteral. La vía parenteral para la administración de los nanocontenedores se ajusta a los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía preferiblemente intravenosa, intraperitoneal o intraarterial. Alternativamente, para evitar una exposición sistémica innecesaria, se pueden utilizar inyecciones supracoroideas o retrobulbales que administren el nanocontenedor, por ejemplo liposomas, por ejemplo directamente en la coriocapilar detrás del ojo. Otra vía alternativa de administración parenteral son las inyecciones intravítreas directas. En este caso, se pueden utilizar nanocontenedores conjugados con GSH, pero también se pueden emplear nanocontenedores sin un ligando dirigido, como los liposomas PEGilados, ya que en tal caso el nanocontenedor puede actuar como un reservorio y liberar lentamente el fármaco encapsulado en el sitio de acción, reduciendo así la necesidad de administración repetida, o permitiendo reducir la frecuencia de administración repetida.

[0068] Alternativamente, o además, el nanocontenedor se administra mediante aplicación tópica u ocular. Preferiblemente, el nanocontenedor se administra usando gotas para los ojos convencionales.

[0069] En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica. La composición farmacéutica de la invención comprende un nanocontenedor como se define anteriormente en el presente documento. La composición comprende además preferiblemente un portador, medio o vehículo de administración farmacéuticamente aceptable como se conoce convencionalmente en la técnica. También se pueden incorporar a las composiciones farmacéuticas disolventes, agentes estabilizantes, agentes osmóticos, agentes tampón, agentes dispersantes y similares farmacéuticamente aceptables. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica previstos. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible y no tóxica adecuada para administrar los ingredientes activos, es decir, el nanocontenedor de la invención a un paciente o sujeto.

[0070] La preparación con los nanocontenedores para administración parenteral debe ser estéril. La esterilización se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. El nanocontenedor se administra de forma continua mediante infusión o inyección en bolo. Se podría preparar una composición típica para infusión intravenosa que contenga de 10 a 500 ml de NaCl al 0,9 % estéril o 5 % de glucosa suplementada opcionalmente con 20 % de solución de albúmina y la dosis requerida del nanocontenedor. Alternativamente, el nanocontenedor se puede disolver en tampón fosfato salino (PBS). Una composición farmacéutica típica para inyección intravenosa, intraperitoneal o intraarterial se prepararía para contener, por ejemplo, 1 - 10 ml de solución acuosa tamponada fisiológica estéril y la dosis requerida del nanocontenedor de la invención. Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en diversas fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (Ed. AR Gennaro, 20.ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE. UU.).

[0071] Los nanocontenedores de la invención se administran preferiblemente en dosis de entre 0,1 y 1 000 mg/kg una vez cada 1 o 2 días. Preferiblemente, el rango de dosificación tiene un límite inferior de al menos 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 10, 20, 50 o 100 mg/kg una vez cada 1 o 2 días y un límite superior de no más de 1000, 500, 200 o 100 mg/kg una vez cada 1 o 2 días. Las dosis indicadas corresponden a la cantidad del agente terapéutico (por ejemplo los análogos de cGMP) tal como están comprendidos en el nanocontenedor y no en toda la composición del nanocontenedor. Alternativamente, los nanocontenedores de la invención se administran por vía intravítrea una vez cada dos semanas o una vez cada 6 semanas. Preferiblemente, el rango de dosificación para inyección intravítrea tiene un límite inferior de al menos 25 µl (2 mg/ml) una vez cada 6 semanas y un límite superior de no más de 200 µl (4 mg/ml) una vez cada dos semanas.

[0072] Para aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas que comprenden los nanocontenedores de la invención se administran a un paciente que padece una patología, afección o trastorno como se ha descrito anteriormente en una cantidad suficiente para reducir la gravedad de los síntomas y/o prevenir o detener el desarrollo adicional de los síntomas. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una dosis "terapéuticamente" o "profilácticamente eficaz". Estas dosis efectivas dependerán de la gravedad de la afección y del estado general de salud del paciente.

[0073] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utiliza en su sentido no limitativo para significar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos está presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" o "una" suele significar "al menos uno".

[0074] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

[0075]

Figura 1. Efectos protectores *in vitro* de DF003 (Rp-8-Br-PET-cGMPS) y LP-DF003 (Rp-8-Br-PET-cGMPS encapsulados en liposomas conjugados con GSH preparados como se describe en el Ejemplo 1). DF003 redujo significativamente la muerte de células *rd1* similares a fotorreceptores, en concentraciones tan bajas como 100 nM. Este efecto se incrementó con LP-DF003, que seguía siendo eficaz cuando se usaba para producir una dosis que correspondía a 10 nM de DF003. Al mismo tiempo, las células de tipo fotorreceptor de tipo salvaje (wt) no se vieron afectadas ni por DF003 ni por LP-DF003, incluso en la concentración más alta utilizada (50 µM). B) De manera similar, DF003 redujo la muerte de fotorreceptores en cultivos de explantes de retina *rd1* organotípicos, mientras que no mostró signos de toxicidad en cultivos de explantes wt.

Figura 2. LP-DF003 protege los fotorreceptores en tres modelos animales de retinosis pigmentaria diferentes. La supervivencia de los fotorreceptores se evaluó en tres diferentes modelos *in vivo* de ratón con retinosis pigmentaria, en el día posnatal (PN) PN14 en ratones *rd1*; y en PN30 en ratones *rd2* y *rd10*. Las barras verdes representan la situación del tipo salvaje (wt); las barras rojas representan la situación del mutante no tratado. A) Los animales *rd1* tratados con DF003 libre no mostraron ninguna mejora en la supervivencia de los fotorreceptores en comparación con los *rd1* no tratados. Por el contrario, el tratamiento con LP-DF003 preservó significativamente fotorreceptores *rd1* en PN14. B) En PN30 degeneración de la retina en ratones *rd2* ha provocado la pérdida de aprox. 15 % de los fotorreceptores, mientras que en la retina *rd10* a la misma edad se pierde alrededor del 80 %. En ambos animales *rd2* y *rd10*, el tratamiento con LP-DF003 aumentó significativamente el número de fotorreceptores supervivientes.

Figura 3. LP-DF003 preserva la viabilidad y función de los fotorreceptores en animales *rd10 in vivo*. En ratones, la retinosis pigmentaria progresa desde el centro (nervio óptico = 0°) hacia la periferia (90°). A) LP-DF003 rescató fotorreceptores *rd10* (ONL) en las partes dorsales de la retina periférica, lo que indica una progresión más lenta de la enfermedad. B) Respuestas electrorretinográficas (ERG) representativas en pacientes no tratados (rojo) y animales *rd10* tratados con LP-DF003 (naranja). Se muestran rastros de adultos de tipo salvaje (verde) a modo de comparación. El gráfico de barras muestra que las amplitudes promedio (n=7) de ERG de la onda "b" son de 4 a 5 veces mayores en los animales *rd10* tratados.

Figura 4. Farmacocinética de DF003 y LP-DF003. Un estudio farmacocinético en ratas adultas reveló una fuerte extensión de la vida media *in vivo* de LP-DF003 frente a DF003 libre. Mientras que el DF003 gratuito tenía una vida media *in vivo* de alrededor de 15 minutos, LP-DF003 mostró una vida media de aproximadamente 24 horas.

Figura 5. Imágenes SLO *in vivo* demuestran una administración exitosa a la retina. Se analizaron *in vivo* ratones inyectados en el día posnatal (PN) 10 con un sistema de administración de fármacos liposomal marcado con fluorescencia en PN14 y PN20 mediante oftalmoscopia con láser de barrido (SLO). La aplicación tópica (no mostrada) y la inyección intravítrea (a) y subtenoniana (b) no mostraron una captación retiniana significativa de la etiqueta. Sin embargo, la inyección intravenosa (c) e intraperitoneal (d), ambas, dieron como resultado un marcado fluorescente fuerte de los vasos sanguíneos de la retina y la neurorretina en PN14, es decir, 4 días después de la aplicación.

En PN20 la mayor parte de la etiqueta había desaparecido, aunque después de la inyección intraperitoneal, los parches retinianos definidos todavía mostraban cierta fluorescencia.

Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1 Producción de liposomas conjugados con GSH que encapsulan cGMPS

[0076] Primero, se prepararon micelas mezclando (relación molar 1:1,5) DSPE-PEG2000-maleimida (NOF, Grobbendonk, Bélgica, 916 mg en 36,72 ml de agua DI) con glutatión (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos, 144 mg en 4,42 ml de agua DI) a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se agregaron micelas a hidrato de acetato de calcio (4094 mg en 57,36 ml de agua DI; concentración final 200 mM) y se mantuvieron a 60°C durante 30 minutos.

[0077] Se disolvieron 2808 mg de HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada; concentración final 28 mM) y 912 mg de colesterol (concentración final 18,6 mM) en 30,96 ml de etanol en un frasco de suero, se mezclaron con las micelas mientras se agitaban y se incubaron en un baño de agua durante 30 min. a 60°C. Finalmente, los liposomas se extruyeron usando membrana de PC de 0,2/0,2 µm (2 veces), membrana de PC de 0,2/0,1 µm (2 veces) y membrana de PC de 0,1/0,1 µm (2 veces) a 60°C y se almacenaron a 4°C. El tamaño de los liposomas se midió con 10 µl de la suspensión liposomal diluida en 1 ml de PBS mediante el método de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El tamaño medio de los lotes de liposomas estaba entre 100 y 120 nm, PdI<0,1. Después de medir el tamaño, los liposomas de acetato de calcio se purificaron a partir de hidrato de acetato de calcio no encapsulado utilizando el sistema de diálisis TFF (Millipore Cogent µScale y Millipore Pellicon cassette de 50 cm^2). Los liposomas se dializaron frente a 7 volúmenes de solución salina (NaCl al 0,9 %). El lote se concentró nuevamente hasta el volumen inicial de 120 ml usando diálisis con un sistema TFF y se analizó el contenido y tamaño de lípidos.

[0078] LP-DF003 se generó mediante carga remota de liposomas GSH-PEG de acetato de calcio con DF003 (Rp-8-Br-PET-cGMPS) en una relación molar fármaco/fosfolípido de 0,3. Para esto, se mezcló 1 volumen de DF003 disuelto en MilliQ (40 mg/ml) con 9 volúmenes de liposomas (HSPC 20 mg/ml, ambos precalentados a 60°C) y se incubaron a 60°C durante 45 min. Posteriormente, el lote se almacenó a 4°C, se purificó y analizó. La purificación se realizó mediante diálisis utilizando un sistema TFF. Los liposomas LP-DF003 se dializaron frente a 10 volúmenes de solución salina, se concentraron hasta una concentración de DF003 de 3 mg/ml y se filtraron de forma estéril con un filtro de 0,2 µm (filtro de jeringa estéril Corning) y se almacenaron a 4°C. DF003 encapsulado, es decir, LP-DF003 y otros componentes de los liposomas se analizaron mediante HPLC.

[0079] Para la encapsulación de Sp-8-Br-PET-cGMPS y 8-Br-PET-cGMP mediante carga remota, se aplica esencialmente el mismo procedimiento que el anterior para la encapsulación de LP-DF003.

[0080] También se probó la encapsulación mediante carga remota de DF001 (Rp-8-Br-cGMPS), DF002 (Rp-8-pCPT-cGMPS) y Rp-8-pCPT-PET-cGMPS, utilizando varias condiciones experimentales (incluida la relación fármaco-lípido, pH extraliposomal, pH intraliposomal y concentración de acetato de calcio intraliposomal) se evaluaron para facilitar y mantener la encapsulación de estos fármacos. A diferencia de DF003, no fue posible la encapsulación mediante carga remota de DF001, DF002 y Rp-8-pCPT-PET-cGMPS.

[0081] Rp-8-Br-cGMPS, Rp-8-pCPT-cGMPS, Rp-8-Br-PET-cGMPS (DF003) y Rp-8-pCPT-PET-cGMPS se obtuvieron de BIOLOG Life Science Institute GmbH, Bremen, Alemania.

1.2 Animales para cultivo de explante de retina *in vitro* y para estudios *in vivo*

[0082] Los animales para la preparación de cultivos primarios de células de retina se mantuvieron en el CSSI (Centro Servizi Stabulario Interdipartimentale) de la Universidad de Módena y Reggio Emilia. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Módena y Reggio Emilia (Prot. N. 106 22/11/2012) y por el Ministerio de salud italiano. Los animales para estudios de explantes de retina *in vitro* se mantuvieron en el departamento de ciencias clínicas de la Universidad de Lund. Se utilizaron ratones modelo de retinosis pigmentaria *rd1* y *rd2* con sus correspondientes controles de tipo salvaje (wt). Los animales se mantuvieron bajo iluminación cíclica blanca estándar, con acceso *ad libitum* a alimentos y agua, y fueron utilizados

independientemente del género. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los comités suecos de ética y cuidado de animales. Se hicieron esfuerzos para mantener el número de animales utilizados y su sufrimiento al mínimo.

[0083] Los animales para estudios *in vivo* se mantuvieron en el alojamiento interno para animales del Instituto de Investigación Oftálmica de Tubinga, bajo iluminación cíclica blanca estándar, tuvieron libre acceso a alimentos y agua y se utilizaron independientemente del género. Los ratones C3H rd1/rd1 (*rd1*) y control C3H de tipo salvaje (wt) fueron para pruebas *in vivo* iniciales. Después de pruebas exitosas en animales *rd1*, las pruebas *in vivo* se ampliaron a otros modelos animales RD para la validación entre modelos. Estos modelos animales adicionales fueron: ratones C3H rd2/rd2 (*rd2* o *rds*), C57Bl6J rd10/rd10 (*rd10*), C57Bl6J cpfl1/cpfl1 (*cpfl1*), así como ratas Rho P23H. Todos los procedimientos *in vivo* se realizaron de acuerdo con el comité de ética local de la Universidad de Tubinga (§4 registros del 29-04-10; 30-06-10; 11-03-11; permiso para animales AK5/12) y la declaración ARVO para el uso de animales en investigaciones oftálmicas y visuales.

1.3 Preparación, diferenciación y tratamiento del cultivo primario de células de retina

[0084] Se probaron diferentes dosis de DF003 y LP-DF003 *in vitro* en un cultivo primario de células de retina derivadas del modelo de ratón *rd1*. Alrededor de 20-30 % de las células primarias se pueden diferenciar en fotorreceptores de bastón (Demontis *et al.* 2012, PLoS One. 7, e33338; Giordano *et al.* 2007, Mol. Vis. 13, 1842-1850). Se aislaron células madre de retina de ratón adulto *wt* y *rd1* del epitelio ciliar después del tratamiento con 2 mg/ml de dispasa (20 min) seguido de 1,33 mg/ml de tripsina, 0,67 mg/ml, hialuronidasa y 0,13 mg/ml de ácido quinurénico (10 min) y se cultivaron durante una semana en medio libre de suero que contiene 20 ng/ml de FGF básico, 2 µg/ml de heparina, 0,6 % de glucosa, mezcla de hormonas N2 en DMEM-F12 para formar neuroesferas (Giordano *et al.*, 2007, *supra*). Luego se colocaron neuroesferas retinianas en portaobjetos de vidrio recubiertos con matriz extracelular (ECM, Sigma) en DMEM-F12 suplementado con 20 ng/ml de FGF durante 4 días. Se permitió que las células se diferenciaran en DMEM-F12 suplementado con FBS al 1 %. Células diferenciadas de retina *rd1* activaron un programa de muerte celular al 11º día de diferenciación como se publicó anteriormente (Sanges *et al.* 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 103, 17366-17371). Las células se expusieron a diferentes dosis de LP-DF003 el día 10 de diferenciación (un día antes de la activación de las vías de muerte celular). 16 horas después del tratamiento con LP-DF003, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. La muerte celular se evaluó mediante tinción de las células durante 2 minutos con homodímero de etidio 2 µM y contratinción de los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma). Los portaobjetos se montaron con mowiol 4-88 (Sigma) y se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 40. Las células positivas al homodímero de etidio se contaron en cada portaobjetos y se expresaron como porcentajes del número total de células (teñidas con DAPI) por portaobjetos. El análisis de la prueba t de Student pareada comparó datos derivados de al menos tres células de retina *rd1* diferentes no tratadas y al menos tres diferentes tratadas.

1.4 Cultivo organotípico de explante de retina

[0085] Para análisis bioquímicos y comparaciones entre modelos y tejidos wt, normalmente se usa material de edades correspondientes al inicio de la degeneración de la retina. El tejido retiniano se obtiene de animales del día 5 posnatal (PN5), de los cuales, después del sacrificio, se enuclean los ojos y se cultivan las retinas como explantes de retina. En resumen, la retina con el epitelio pigmentario de la retina (RPE) todavía adherido se aísla y posteriormente se transfiere a insertos de filtro de placa de cultivo Millicell (Millipore AB, Solna, Suecia; PIHA03050), con la capa de RPE frente a la membrana de cultivo. Luego, los explantes se incuban en un medio nutritivo R16 personalizado a 37°C. El medio nutritivo tiene un volumen de 1,5 ml por placa, que se reemplaza con medio fresco generalmente cada dos días (a menos que el paradigma de cultivo exacto requiera lo contrario) durante el período de cultivo.

[0086] Se permitió que los explantes de PN5 se ajustaran a las condiciones de cultivo durante dos días *in vitro* (DIV), tras lo cual fueron sometidos a tratamientos de interés. En este punto, el paradigma de tratamiento consistía en la adición de medio con compuesto de prueba cada dos días durante cuatro días, alcanzando el equivalente a PN11 (etiquetado como tratamiento a corto plazo: PN5 + 2 DIV + 4 DIV) o a PN19 (tratamiento a largo plazo: PN5 + 2 DIV +12 DIV).

[0087] Al final del período de cultivo del explante, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4 % en una solución salina tamponada con fosfato durante aproximadamente 2 h a 4°C. Los ojos así fijados se crioprotegieron en tampón de sacarosa de Sorensen, se realizó un corte histológico utilizando un criotomo y se recogieron criosecciones de 12 µm en portaobjetos de microscopio.

1.5 Pruebas de fármacos en modelos animales RD *in vivo*

[0088] Antes del tratamiento con fármaco o combinaciones de fármaco/DDS, los animales fueron anestesiados con éter dietílico. Para el tratamiento sistémico, se inyectó una solución de NaCl al 0,9 % que contenía DDS liposomal/formulación del fármaco en la vena de la cola (vena caudal; intravenosa; *i.v.*; 50 µl) o en el peritoneo

(intraperitoneal; ip; 200 µl) del animal anestesiado. En ratones *rd10*, también se probó un tratamiento intravítreo local (IVT). En este caso, los animales recibieron una inyección de 0,5 µl en el cuerpo vítreo de un ojo, mientras que el otro ojo se mantuvo como control contralateral sin tratar. Para ambos tratamientos *i.p.* e IVT una formulación liposomal que no contiene DF003 (es decir, liposomas "vacíos") se utilizó como control adicional.

[0089] El tratamiento *in vivo* se realizó inicialmente en animales *rd1*, pero luego se extendió a otros modelos animales (*rd2, rd10, cpfl1*, Rho P23H). Debido al diferente inicio y progresión de la degeneración de la retina en los diferentes modelos RD, los paradigmas de tratamiento tuvieron que adaptarse a cada modelo. Para obtener detalles sobre estos paradigmas de tratamiento, véase la Tabla 1.

[0090] En varios momentos posteriores al tratamiento (véase la Tabla 1), se utilizó tomografía de coherencia óptica (OCT) *in vivo* y análisis de oftalmoscopia láser de barrido (SLO) para obtener imágenes directas y no invasivas de la morfología de la retina (OCT) y de fármacos marcados con fluorescencia (SLO) o combinaciones de fármaco/DDS para determinar la distribución y absorción del fármaco en la retina. Además, la función de la retina se evaluó mediante registros electrorretinográficos (ERG). Después de exámenes *in vivo* no invasivos, y entre 1 y 12 días después del tratamiento, los animales de experimentación fueron sacrificados por asfixia con dióxido de carbono. Los ojos se enuclearon inmediatamente, se fijaron durante 2 h en PFA al 4 % y se prepararon para criosección o preparación de montaje completo.

Tabla 1. Paradigmas de tratamiento *in vivo* para cinco modelos RD diferentes

Modelo animal, Especie	**Inicio del tratamiento**	**Intervalos/dosis de tratamiento**	**Análisis *In vivo***	**Fin del tratamiento**
ratón *rd1*	PN10 (*i.v.* + *i.p.* en el primer día)	Una vez al día/ 200 µl	PN14, 18, (30)	PN17
ratón *rd2*	PN14	Cada 2 días/ 200 µl	PN18, 30, 60	PN59
ratón *rd10*	PN14	Una vez al día/ 200 µl	PN18, 24, 30	PN29
IVT del ratón *rd10*	PN14	PN14, 16, 18, 22, 26/ 0,5 µl	PN30	PN26
ratón *cpfl1*	PN14	Una vez al día/ 200 µl	PN24, 30	PN29
rata Rho P23H	PN14	Cada 4 días / 400 - 3200 µl	PN30, 60, 120	PN118

1.6 Cuantificación de la muerte y supervivencia de las células fotorreceptoras

[0091] Las lecturas para los experimentos de tratamiento *in vitro* e *in vivo* consistieron en la cuantificación de células fotorreceptoras teñidas positivamente para el marcador de muerte celular TUNEL y/o el recuento de filas de fotorreceptores supervivientes, como se observa en las tinciones de tejido histológico estándar. En ambos casos, los resultados se capturaron mediante un microscopio y una cámara digital, se analizaron manual o semiautomáticamente y luego se realizaron cálculos de significación estadística de los datos registrados, en principio como se publicó anteriormente (Arango-González *et al.* 2014, PLoS One. 9, e112142).

2. Resultados

2.1 Protección de fotorreceptores *in vitro* e *in vivo* por LP-DF003

[0092] Se generaron más de 200 nuevos análogos de cGMP, de los cuales 140 fueron probados para determinar su capacidad para unirse a PKG en ensayos libres de células (Zegzouti *et al.* 2009, Assay. Drug Dev. Technol. 7, 560-572). De estos, se seleccionaron 33 compuestos que exhibían una fuerte unión PKG para su posterior análisis *in vitro* en la línea celular 661W y en cultivos de células similares a fotorreceptores derivados de ratones mutantes con retinosis pigmentaria (Sanges *et al.* 2006, *supra*). Este ensayo de cribado celular identificó 11 compuestos que podrían reducir la muerte celular causada por mutaciones de la retinosis pigmentaria y, por lo tanto, mostró actividad protectora de los fotorreceptores. Estos 11 compuestos se probaron posteriormente en cultivos de explantes de retina organotípicos (Sahaboglu *et al.* 2013, Cell Death & Disease 4) derivado de ratones de tipo salvaje, *rd1* (Sanyal y Bal 1973, Z. Anat. Entwicklungsgesch. 142, 219-238) o ratones *rd2* (Sanyal y Jansen 1981, Neurosci. Lett. 21, 23-26). Los cultivos de tejido de retina redujeron el número de análogos de cGMP con efectos neuroprotectores prometedores a 4 compuestos, que redujeron significativamente la muerte celular de fotorreceptores *rd1* y *rd2 in vitro*.

[0093] Estos 4 compuestos luego fueron probados *in vivo* en ratones *rd1*, y uno de estos en combinación con el sistema de administración liposomal (LP). LP-DF003 mostró los efectos protectores más pronunciados en animales *rd1* y luego fue sometido a pruebas en otros dos modelos de ratón *in vivo* para la retinosis pigmentaria

(ratones *rd2* y *rd10*). Se realizó otro estudio a largo plazo (4 meses) en un cuarto modelo de retinosis pigmentaria, la rata P23H (datos no mostrados).

[0094] En los diferentes sistemas de prueba, DF003 arrojó los siguientes resultados: DF003 preservó la viabilidad de los fotorreceptores *rd1* enfermos en cultivos de células y tejidos organotípicos de retina (Figura 1 A, B). En ambos sistemas, los fotorreceptores de tipo salvaje (wt) no se vieron afectados por el tratamiento con DF003, lo que indica que no era tóxico para estas células hasta una concentración de 50 µM. LP-DF003 mostró efectos protectores mejorados en comparación con DF003 en concentraciones bajas en cultivos de células similares a fotorreceptores derivados de ratones mutantes con retinosis pigmentaria (Figura 1A)

[0095] En explantes de retina organotípicos, no se encontró evidencia de toxicidad por DF003 en la retina interna (datos no mostrados). DF003 también evitó la muerte de fotorreceptores en explantes de retina de otros dos modelos, el modelo *rd10* de degeneración más lenta, que también tiene una mutación *Pde6b*, pero en un sitio diferente al modelo *rd1*, así como la degeneración aún más lenta del modelo de ratón *rd2* a pesar de la mutación muy diferente que porta el ratón *rd2* (datos no mostrados, pero véase la Figura 2 para datos *in vivo* de *rd10* y *rd2*). Véase también a continuación para obtener más detalles sobre estos modelos. Se hicieron observaciones similares para Sp-8-Br-PET-cGMPS.

[0096] La biodisponibilidad de DF003 *in vivo* mejoró dramáticamente cuando se usó en su formulación liposomal LP-DF003 (cf. Sección 2.3; Figura 4). Además, la biodisponibilidad de Sp-8-Br-PET-cGMPS mejora cuando se encapsula en liposomas.

[0097] Para evaluar los efectos de LP-DF003 *in vivo*, se utilizaron tres modelos animales de retinosis pigmentaria diferentes que portaban defectos genéticos homólogos a las mutaciones de la retinosis pigmentaria humana. El ratón *rd1* es un modelo animal para la retinosis pigmentaria con pérdida de función del gen Pde6b, lo que lleva a una rápida muerte celular de los fotorreceptores de bastones hasta el día 18 posnatal (PN) (Sanyal y Bal 1973, *vide supra*). En PN14 la retina *rd1* ha perdido más del 50 % de sus filas de fotorreceptores, en comparación con el wt (Figura 2A). Si bien la administración sistémica de DF003 mediante inyección intraperitoneal (50 mg/kg una vez al día) no tuvo efecto sobre la supervivencia de los fotorreceptores *rd1*, el tratamiento con LP-DF003 a la misma concentración aumentó significativamente la viabilidad de los fotorreceptores *rd1*.

[0098] El ratón *rd2* (rds) es otro modelo de retinosis pigmentaria que porta una mutación en el gen *Prph2* que lleva a una pérdida relativamente lenta de fotorreceptores de conos y bastones en los primeros tres meses posnatales (Sanyal y Jansen 1981, *vide supra*). En PN30 alrededor del 15 % de fotorreceptores *rd2* se pierden. Ya a esta edad los animales *rd2* tratados con LP-DF003 (50 mg/kg cada dos días) mostraron un aumento significativo en el número de filas de fotorreceptores supervivientes (Figura 2B).

[0099] El tercer modelo animal utilizado fue el ratón *rd10* con una mutación puntual en el gen *Pde6b*. Aquí la degeneración es más lenta en comparación con la retina mutante *rd1* y la pérdida de fotorreceptores de bastones comienza en PN18 y alrededor del 80 % se pierde en PN30. También en animales *rd10*, la administración sistémica de LP-DF003 mediante inyección intraperitoneal (*i.p.*; 50 mg/kg una vez al día) aumentaron significativamente la supervivencia de los fotorreceptores en PN30 (Figura 2B). El mismo tratamiento *i.p.* de ratones *rd10* con liposomas de control que no contenían DF003 (liposomas "vacíos") no produjo diferencias significativas con respecto a los animales *rd10* no tratados.

[0100] Los datos mostrados en la Figura 2 confirmaron que la supervivencia general de los fotorreceptores mejoró con el tratamiento con LP-DF003. Dado que en los modelos de retinosis pigmentaria en roedores la degeneración de los fotorreceptores progresa desde el centro hacia la periferia, el efecto protector fue más pronunciado en la periferia. Esto se evaluó mediante los llamados diagramas de araña, que muestran la cantidad de fotorreceptores supervivientes en función de la excentricidad del nervio óptico, es decir, el centro de la retina. Así, en la periferia de la retina de animales *rd10* tratados con LP-DF003 había aproximadamente dos veces más fotorreceptores supervivientes que en sus homólogos no tratados (Figura 3A).

[0101] Lo que es más importante, *i.p.* LP-DF003 mejoró enormemente la funcionalidad *in vivo* de la retina evaluada mediante registro ERG en animales *rd10*. En ERG, la desviación negativa de la respuesta eléctrica a la luz, la llamada onda "a", refleja la respuesta primaria de los fotorreceptores. La posterior desviación positiva, la llamada onda "b", corresponde a la respuesta de la retina interna y a la activación de neuronas de segundo orden. Mientras que los animales adultos wt muestran respuestas ERG que van desde -350 µV (onda "a") a 600 µV (onda "b"), el ERG de los animales *rd10* no tratados casi se extingue en PN30 (respuesta máxima de onda "b" ≈ 35 µV) (Figura 3B). A diferencia de, *i.p.* LP-DF003 mejoró fuerte y significativamente respuestas de onda "b" de ERG (≈ 180 µV) *rd10*, correspondientes a una mejora de 4 a 5 veces de la función retiniana.

[0102] Se obtuvieron resultados similares cuando animales *rd10* fueron tratados con LP-DF003 mediante inyección intravítrea (IVT). Los ojos inyectados mostraron un fuerte aumento en el número de filas de fotorreceptores supervivientes (tratados: 4,66 ± 0,45 SEM, contralateral: 1,57 ± 0,17 SEM, n=8, p=0,0002). Esto

se reflejó en un aumento correspondiente en las respuestas funcionales ERG, que en PN30 mostraron un aumento muy significativo a ≈ 250 µV en los ojos tratados.

[0103] En general, los resultados del tratamiento con LP-DF003 en los diferentes modelos animales de retinosis pigmentaria son muy alentadores y resaltan fuertemente el potencial de LP-DF003 para el desarrollo de un tratamiento independiente de mutaciones para varias formas diferentes de retinosis pigmentaria humana.

[0104] Cuando los efectos *in vivo* de Sp-8-Br-PET-cGMPS encapsulados en liposomas se comparan con Sp-8-Br-PET-cGMPS ordinario; en los modelos animales anteriores, se observa una mejora similar en el potencial biológico mediante la encapsulación de Sp-8-Br-PET-cGMPS se observa como se encontró para LP-DF003 en comparación con DF003.

2.2 Farmacología

[0105] El compuesto activo DF003 es un análogo de cGMP y bloquea la actividad de PKG con alta especificidad. Esto es particularmente cierto para las isoformas PKG1α y PKG1β, mientras que PKG2 está menos inhibida. Las constantes inhibidoras para los otros dos objetivos potenciales, CNGC y las isoformas 1 y 2 de la proteína quinasa A (PKA), son 2-3 unidades logarítmicas más altas (Tabla 2) que las de las isoformas PKG. El cGMP y sus análogos se dirigen a PKG y CNGC, pero también podrían interferir con la actividad de los canales PKA, PDE o incluso HCN. La tabla proporciona las constantes inhibidoras (K_i) de DF003 para estos objetivos y (cuando esté disponible) los valores IC_{50}.

Tabla 2. Constantes inhibidoras para DF003

Objetivo	**PKG1α**	**PKG1β**	**PKG2**	**CNGC**	**PKA1**	**PKA2**
K_i	0,035 µM	0,03 µM	0,45 µM	n.a.	>50 µM	11 µM
IC_{50}			0,9 µM	25 µM		
Objetivo	**PDE1B**	**PDE2**	**PDE4**	**PDE5**	**PDE10**	
K_i	2,5 µM	0,8 µM	8,1 µM	4,1 µM	5,0 µM	

2.3 Farmacocinética

[0106] Se realizó un estudio farmacocinético en ratas adultas (3 meses de edad) que recibieron una única inyección de DF003 libre o LP-DF003 en una dosis inicial de 20 mg/kg. Los resultados se muestran en la Figura 4. Si bien el DF003 libre se eliminó muy rápidamente del torrente sanguíneo (vida media estimada: 10-15 min), altos niveles de DF003 permanecieron dentro del torrente sanguíneo cuando se administró LP-DF003. En este caso, la vida media estimada fue de 24 horas, lo que corresponde a una extensión de la vida media de 90 a 100 veces, aproximadamente.

[0107] Para garantizar una administración óptima de liposomas (por ejemplo que contienen DF003) a la retina, tanto en ratones como en ratas se probaron una variedad de paradigmas de aplicación para compuestos encapsulados en el sistema de administración de fármacos liposomal. Estos incluyeron la aplicación tópica (gotas para los ojos), la inyección intravítrea en el ojo, la inyección subtenoniana en la cápsula de Tenon que rodea el ojo, la inyección intraperitoneal y la inyección intravenosa. El uso de compuestos trazadores fluorescentes dentro del sistema de administración liposomal hizo posible rastrear directamente la administración del compuesto mediante oftalmoscopia con láser de barrido (SLO; Figura 5). En ratones y ratas, un marcador fluorescente aplicado por vía intravenosa (por ejemplo la fluoresceína) se elimina del torrente sanguíneo en unas pocas horas.

[0108] Sorprendentemente, las aplicaciones directas al ojo o dentro del mismo dieron como resultado ninguna o casi ninguna administración del fármaco a la retina, supuestamente debido a la fuerte adhesión de los liposomas a las estructuras oculares no retinianas (por ejemplo el vítreo). Por el contrario, la administración sistémica de liposomas tanto por vía intravenosa como intraperitoneal produjo una fuerte absorción del compuesto en la retina, lo que puede explicarse, por un lado, por la circulación prolongada en el torrente sanguíneo (cf. Figura 4) y, por otro lado, mediante una facilitación de la transcitosis dirigida a través de la barrera hemato-ocular hacia la neurorretina. En ratones, con formulación liposomal, el marcador fluorescente se pudo visualizar directamente en la retina mediante SLO durante al menos 4 días después de una única inyección intraperitoneal (Figura 5); en ratas (no mostradas), el marcador fue detectable durante al menos 10 días después de la inyección.

2.4. Toxicología

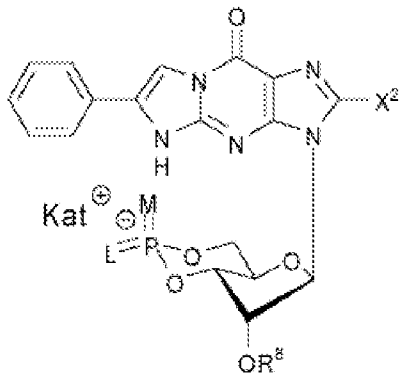
[0109] Ratones y ratas tratados con LP-DF003 (*i.p.*) durante un máximo de dos meses, así como sus controles no tratados, fueron examinados de forma rutinaria *in vivo* y *post mortem*, sin ninguna evidencia macroscópica de efectos tóxicos de los fármacos.

[0110] Animales tratados *in vivo* no mostraron alteraciones en el comportamiento (por ejemplo, apatía, postura encorvada, cifótica), en la apariencia de pelaje (por ejemplo caída del cabello, pelaje graso) o su piel (por ejemplo decoloraciones, hemorragias). Los exámenes oculares *in vivo* no encontraron anomalías (por ejemplo, opacidad del cristalino, cataratas), mientras que las pruebas de ERG funcionales revelaron un mejor rendimiento en los animales tratados con LP-DF003, en comparación con los controles no tratados. Es importante destacar que los animales tratados y no tratados mostraron aumentos de peso normales durante los dos primeros meses posnatales y, en general, no se distinguían entre sí (datos no mostrados). Asimismo, el examen macroscópico *post mortem* de los órganos internos (corazón, hígado, pulmones, riñón, cerebro) no reveló anomalías (tamaño y forma de los órganos, coloración/perfusión) en ratones y ratas tratados con LP-DF003. Cuando los ratones fueron tratados con la dosis más alta de LP-DF003 (200 µl *i.p.*, todos los días), el bazo de algunos animales parecía más grande que en los controles, fenómeno que puede estar relacionado con la administración de lípidos. Si bien este fenómeno no pareció afectar negativamente a los animales, se evaluará más a fondo y la concentración de lípidos en la formulación del fármaco podrá adaptarse en consecuencia.

[0111] En conjunto y basándose en estos datos preliminares, no hay evidencia de ningún efecto toxicológico aparente y fuerte en estos animales bajo las condiciones experimentales utilizadas. En particular, si en la aplicación humana se prevé una inyección intravítrea, las dosis de LP-DF003 a aplicar serían al menos 400-1000 veces inferiores a las utilizadas en los experimentos con ratones y ratas.

REIVINDICACIONES

1. Nanocontenedor farmacéuticamente aceptable que comprende un agente terapéutico para tratar una patología, afección o trastorno asociado con la desregulación de una diana celular afectada por cGMP, donde el agente terapéutico es un análogo de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico según la fórmula II:

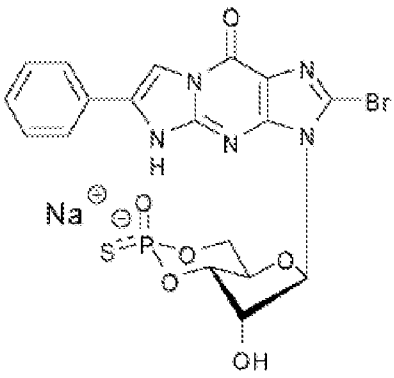


donde

X^2 es hidrógeno, -F, -Cl, -Br, -I, CF_3 o un grupo $-NR^9R^{10}$ o $-SR^{11}$, donde R^9 es hidrógeno y ambos R^{10} y R^{11} son grupos alquilo con un grupo terminal NH_2 u OH,
R^8 es hidrógeno, un grupo (tri)alquilsililo o un grupo acilo, y donde
L es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y M es O(H), o
L es O(H), y M es oxígeno, azufre, borano (BH3) u otro grupo borano sustituido, y
Kat^+ es un protón u otro catión metálico fisiológicamente aceptable o un ion trialquilamonio.

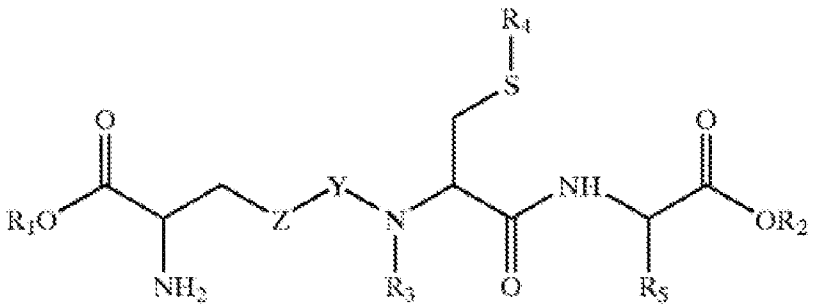
2. Nanocontenedor según la reivindicación 1, donde el nanocontenedor está conjugado con un ligando para un transportador de glutatión.

3. Nanocontenedor según la reivindicación 2, donde el análogo de guanosina-3',5'-monofosfato cíclico tiene la fórmula III:



u otras sales farmacéuticamente aceptables de los análogos de fórmulas III distintas de sus sales de sodio.

4. Nanocontenedor según la reivindicación 2 o 3, donde el ligando se selecciona del grupo que consiste en glutatión, S-(p-bromobencil)glutatión, gamma-(L-gamma-azaglutamil)-S-(p-bromobencil)-L-cisteinilglicina, S-butilglutatión, S-decilglutatión, éster etílico reducido de glutatión, ácido glutatiónsulfónico, S-hexilglutatión, S-lactoilglutatión, S-metilglutatión, S-(4-nitrobencil)glutatión, S-octilglutatión, S-propilglutatión, n-butanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, etanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, hexanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, octanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, dodecanoil gamma-glutamilcisteinilglicina, éster monoisopropil de GSH (N-(N-L-glutamil-L-cisteinil)glicina 1-isopropil éster sulfato monohidrato) y derivados de glutatión de la fórmula V:



donde Z = CH_2 e Y = CH_2, o Z = O e Y = C=O;
R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado (1-25C), aralquilo (6-26C), cicloalquilo (6-25C), heterociclos (6-20C), éteres o poliéteres (3-25C), y donde R_1-R_2 juntos tienen 2-20 átomos de C y forman un macrociclo con el resto de fórmula VI;
R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y CH_3;
R_4 se selecciona del grupo que consiste en 6-8C alquilo, bencilo, naftilo y un guanosina-3',5'-monofosforotioato cíclico terapéuticamente activo; y,
R_5 se selecciona del grupo que consiste en H, fenilo, CH_3- y CH_2-fenilo; o,
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el nanocontenedor es un liposoma que encapsula el agente terapéutico o diagnóstico, y donde el ligando para un transportador de glutatión se conjuga con el liposoma a través de un agente de conjugación bifuncional que comprende un derivado de vitamina E o un fosfolípido unido a un extremo del agente de conjugación y el ligando para un transportador de glutatión unido al otro extremo del agente de conjugación, donde preferiblemente, el agente de conjugación es polietilenglicol que tiene un número de polimerización (n) de entre aproximadamente 6-210, y donde más preferiblemente el polietilenglicol tiene un peso molecular entre 1 000 y 5 000 Da.

6. Nanocontenedor según la reivindicación 5, donde el agente de conjugación se puede obtener haciendo reaccionar distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol-maleimida (DSPE-PEG-MAL) con un ligando para un receptor de glutatión que tiene un grupo tiol reactivo a maleimida y donde preferiblemente el DSPE-PEG- MAL tiene un peso molecular de alrededor de 2 000 Da.

7. Nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando para un receptor de glutatión es glutatión.

8. Composición farmacéutica que comprende un nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un portador farmacéuticamente aceptable.

9. Nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como medicamento.

10. Nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de una patología, afección o trastorno asociado con la desregulación de la diana celular afectada por cGMP, donde preferiblemente la diana es al menos uno de entre una PKG y un CNGC.

11. Nanocontenedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de al menos uno de entre:

a) retinosis pigmentaria u otra enfermedad hereditaria de la retina;
b) degeneración pigmentaria secundaria de la retina como resultado de una enfermedad metabólica o neurodegenerativa, un síndrome o una enfermedad ocular;
c) enfermedades de la retina que comprenden retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, agujero/pucker macular, neoplasias malignas oculares, retinoblastoma, desprendimiento de retina y ceguera de los ríos; y,
d) trastornos neuronales o neurodegenerativos, anosmia, dolor inflamatorio y neuropático, recrecimiento axonal y recuperación después de una lesión de la médula espinal,
e) enfermedades parasitarias como la malaria, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas,
f) enfermedades cardiovasculares, hipertensión, hipotensión, angina de pecho, hipertensión pulmonar, disfunción eréctil, ictus isquémico, ateroesclerosis, cáncer o shock agudo.

12. Nanocontenedor para un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 - 11, donde el nanocontenedor se administra sistémica o localmente.

13. Nanocontenedor para un uso según la reivindicación 12, donde el nanocontenedor se administra mediante al menos uno de entre

a) inyección o infusión por al menos una de las siguientes vías: intravítrea, intravenosa, intraperitoneal e intraarterial; y
b) aplicación tópica u ocular.

14. Nanocontenedor para un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 - 13, donde el nanocontenedor se administra en dosis de entre 0,1 y 1000 mg/kg una vez cada 1 o 2 días, o donde el nanocontenedor se administra por vía intravítrea en dosis de entre 0,0005 y 0,02 mg/kg una vez cada dos semanas o una vez cada seis semanas.

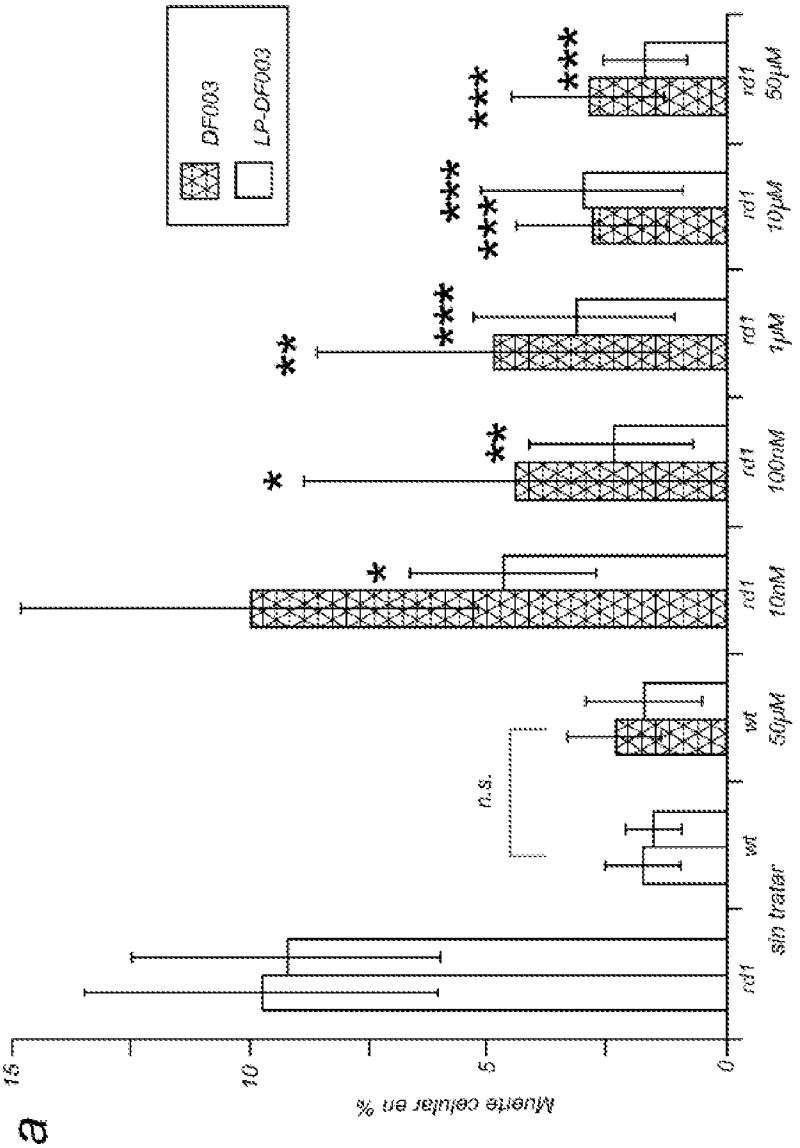

DF003
LP-DF003
Muerte celular en %
0
5
10
15
sin tratar
wt
rd1
n.s.
50µM
10mM
100nM
1µM
10µM
50µM
*
**
***
****

Fig. 1a

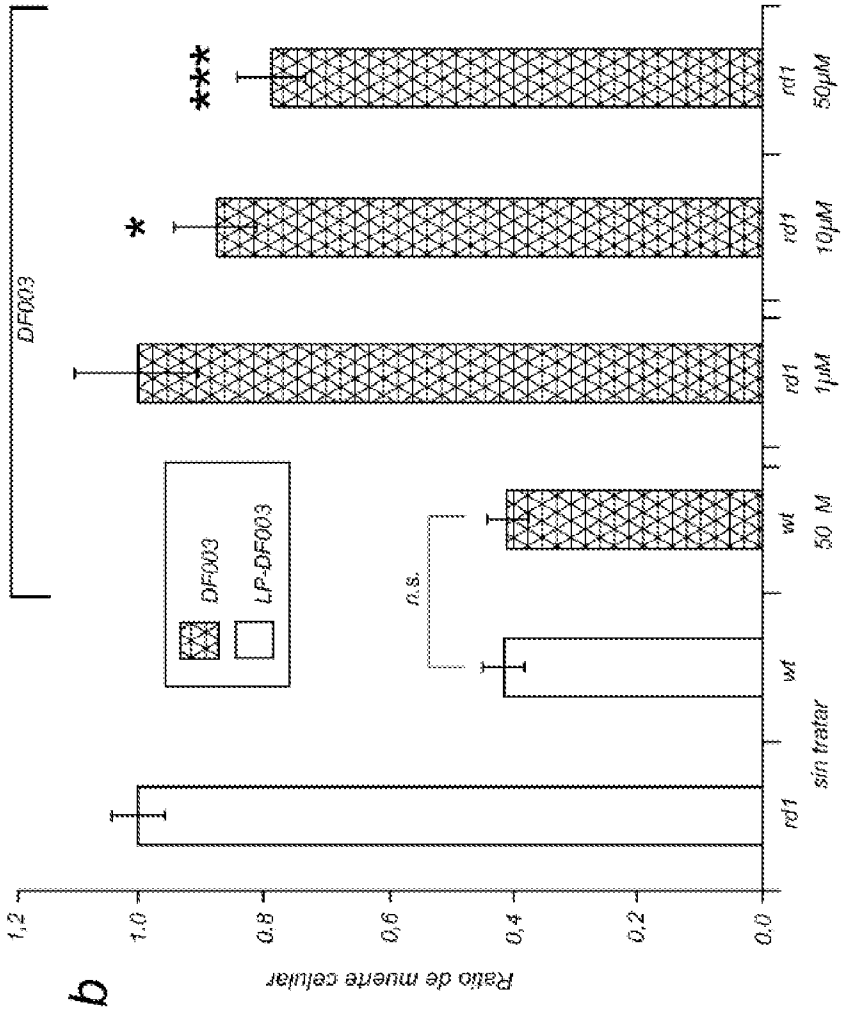

Ratio de muerte celular
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
rd1
wt
wt
rd1
rd1
rd1
sin tratar
50 M
1µM
10µM
50µM
DF003
LP-DF003
n.s.
*
***
DF003

Fig. 1b

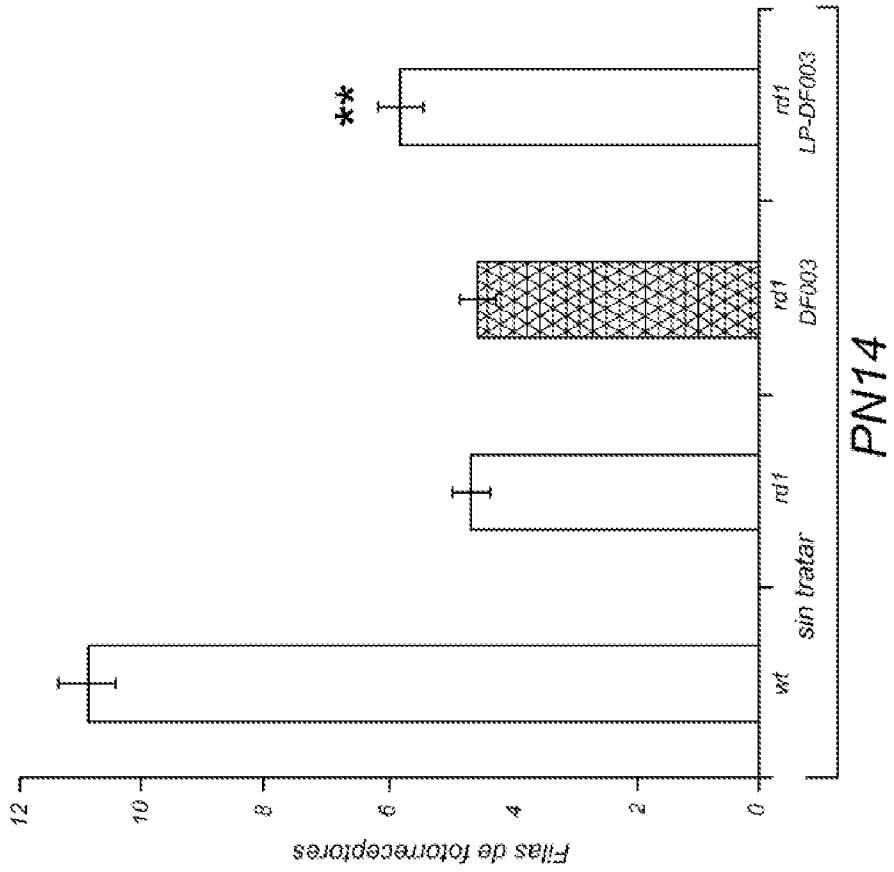

Filas de fotorreceptores
0
2
4
6
8
10
12
wt
rd1
rd1
rd1
sin tratar
DF003
LP-DF003
**
PN14

Fig. 2a

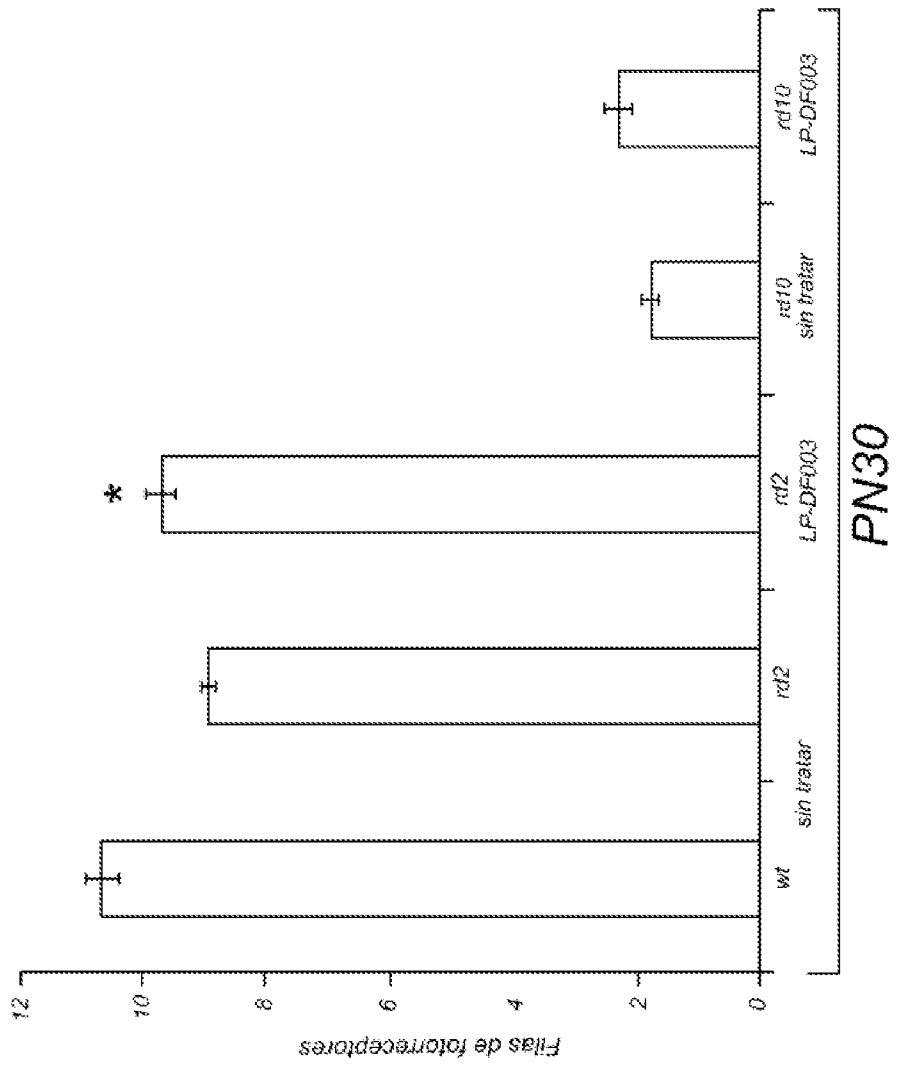

Filas de fotorreceptores
0
2
4
6
8
10
12
*
wt
sin tratar
rd2
rd2
LP-DF003
rd10
sin tratar
rd10
LP-DF003
PN30

Fig. 2b

Fig. 3a

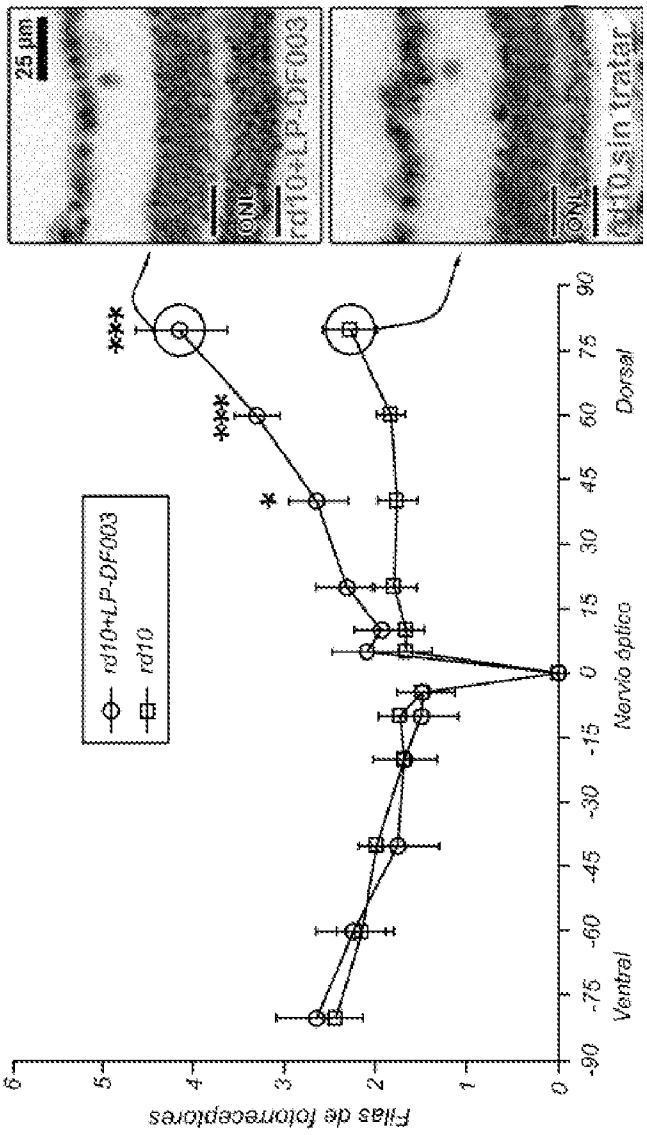

25 µm
ONL
rd10+LP-DF003
rd10 sin tratar
rd10+LP-DF003
rd10
***
***
*
Filas de fotorreceptores
6
5
4
3
2
1
0
-90
-75
-60
-45
-30
-15
0
15
30
45
60
75
90
Ventral
Nervio óptico
Dorsal

Fig. 3b

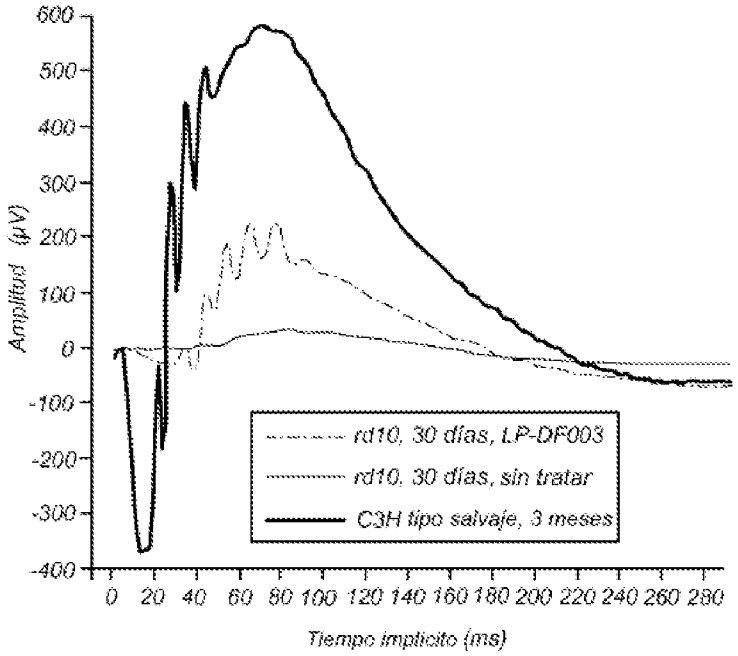

600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
-300
-400
Amplitud (μV)
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280
Tiempo implícito (ms)
rd10, 30 días, LP-DF003
rd10, 30 días, sin tratar
C3H tipo salvaje, 3 meses

Fig. 3c

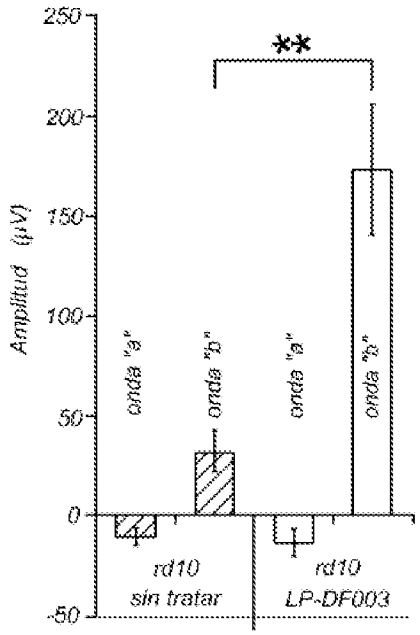

250
200
150
100
50
0
-50
Amplitud (µV)
**
onda "a"
onda "b"
onda "a"
onda "b"
rd10
sin tratar
rd10
LP-DF003

Fig. 4

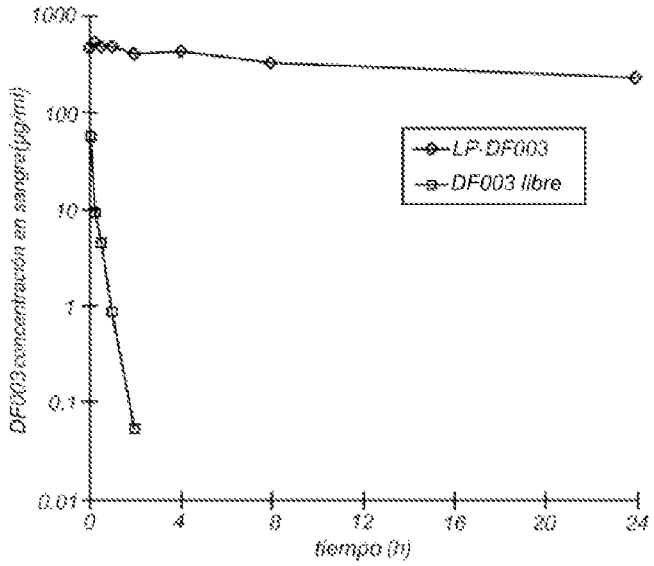

1000
100
10
1
0.1
0.01
DF003concentración en sangre(µg/ml)
0
4
8
12
16
20
24
tiempo (h)
LP-DF003
DF003 libre

Fig. 5a

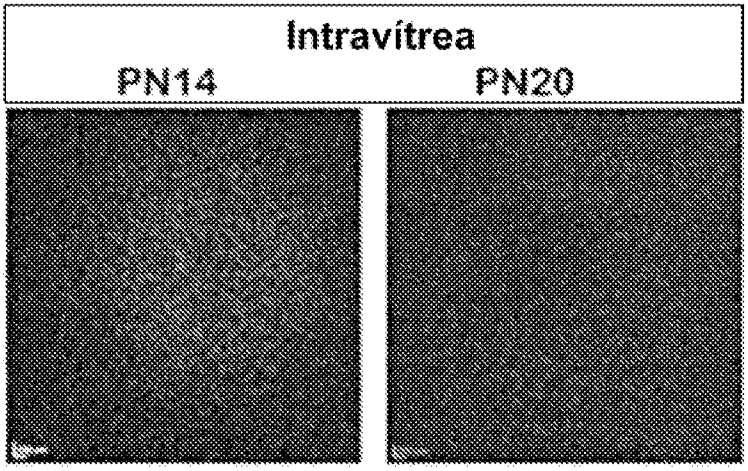


Fig. 5b

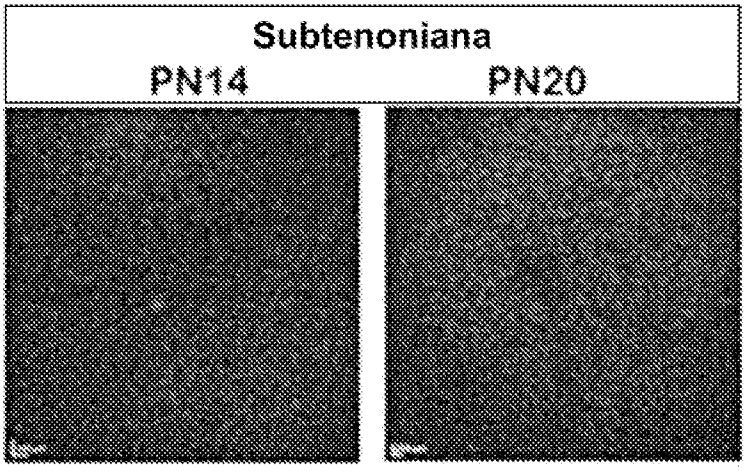


Fig. 5c

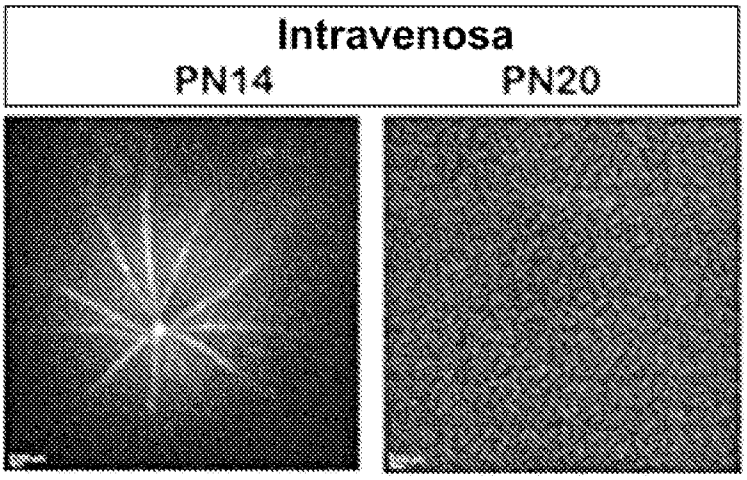


Fig. 5d

