



Desarrollo de nanomedicinas para la terapia de sustitución enzimática en la enfermedad de Fabry

Dr. Simó Schwartz Navarro

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Dra. Maria García Parajo

Institut de Bioenginyeria de Catalunya IBEC

Dr. Fausto Sanz Carrasco

Facultat de Química UB

Dr. Manuel Trías Folch

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

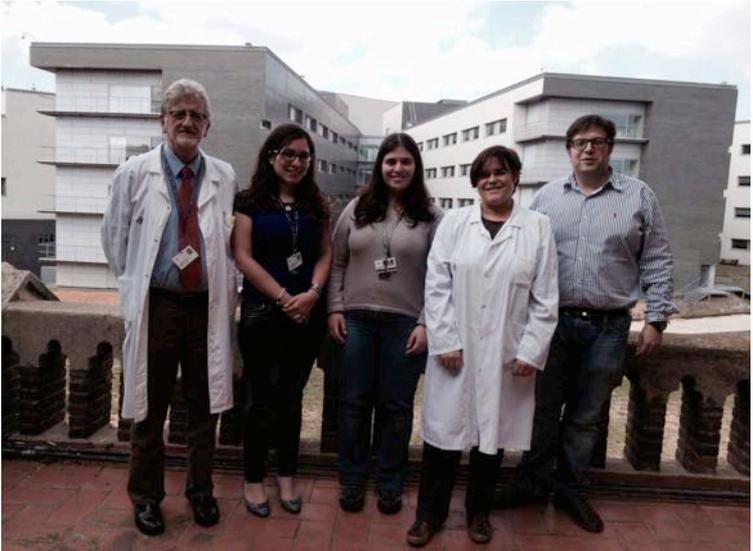
Dr. Jaume Veciana Miró

Institut de Ciència de Materials de Barcelona CSIC

Dr. José Luis Corchero Nieto

Institut de Biotecnologia i Biomedicina UAB







1. Resumen del proyecto

La enfermedad de Fabry (FD) es un trastorno enzimático recesivo ligado al cromosoma X causado por una deficiencia de hidrolasa lisosomal, α -galactosidasa A (GLA). Este defecto enzimático provoca la acumulación celular progresiva de glicoesfingolípidos neutros, dando lugar a una sintomatología clínica multisistémica. La terapia de reemplazo enzimático actual (ERT) presenta una eficacia del tratamiento limitada en pacientes con etapas avanzadas de la enfermedad. El objetivo de este proyecto es mejorar la ERT mediante el uso de nuevos sistemas nanoconjugados terapéuticos de GLA dirigidos específicamente a las células endoteliales, principal tipo de células afectadas por la acumulación de sustrato de la GLA.

El proyecto propone el desarrollo de nanoconjugados de GLA biodegradables que liberen específicamente la enzima defectuosa en los lisosomas de las células endoteliales. El proyecto contempla la obtención y la síntesis de la enzima recombinante GLA, la incorporación de la enzima en tres nanosistemas o nanovehículos diferentes (dendrímeros, complejos polielectrolíticos de quitosano y pequeñas vesículas unilamelares de la familia de los liposomas) y la realización de su biofuncionalización contra integrinas endoteliales específicas. Los nanoconjugados obtenidos serán validados *in vitro* e *in vivo* utilizando el modelo específico de ratón de la enfermedad de Fabry (ratones Fabry KO).

El resultado más importante y esperado del proyecto es lograr que la enzima GLA sea protegida adecuadamente contra proteasas plasmáticas que, a su vez, aumenten su vida media en el torrente sanguíneo y disminuyan su degradación por parte de proteasas circulantes. Además, usar una diana específica para células endoteliales se espera que mejore significativamente la biodistribución tisular y la internalización de los sistemas desarrollados. En general, se espera que el uso del sistema de administración de fármaco basado en la nanotecnología desarrollada (DDS) y que incorpora la GLA mejore significativamente la eficacia terapéutica en comparación con la ERT corriente.

Por tanto, el objetivo general del presente proyecto es mejorar la ERT de FD utilizando nuevos nanoconjugados terapéuticos de GLA dirigidos específicamente a las células endoteliales.

Los objetivos específicos que se han desarrollado a lo largo del proyecto son:

- 1) La obtención de nuevos sistemas de administración de la droga (DDS) cargados con GLA funcionalizados con un péptido diana específico contra células endoteliales.
- 2) Evaluación de la internalización y la actividad *in vitro* de los DDS en modelos de células de Fabry.
- 3) Evaluación de la toxicidad y la biodistribución de los DDS cargados con GLA *in vivo* en modelos de ratones Fabry.
- 4) Estudios de eficacia de DDS cargados con GLA en ratones de Fabry. Evaluación de la reducción de los niveles de Gb3 *in vivo*.

2. Resultados obtenidos

1) Producción de la enzima activa (α -GLA).

La enzima deseada se ha proporcionado cuando ha sido necesario y solicitado por los demás grupos del consorcio en el transcurso de todo el proyecto. La producción de dicha enzima ha sido realizada por expresión génica transitoria (TGE), usando un protocolo basado en la producción de la enzima humana α -GLA en células de mamífero, creado y optimizado por el grupo IBB-CIBER. Durante todo el proyecto se aseguró la producción y purificación de suficientes cantidades de α -GLA producida y almacenada de forma rutinaria.

2) Obtención de nuevos sistemas de liberación de fármacos (DDS) cargados con GLA, funcionalizados con estructuras diana contra las células endoteliales.

De los tres DDS diferentes que fueron propuestos en el proyecto, se han alcanzado diferentes etapas de desarrollo. En concreto:

- Obtención de *dendrimeros-RGD cargados con GLA*. En cuanto a la producción de conjugados dendrímero-GLA, a pesar de que la síntesis con moléculas de oligoetilenglicol (OEG) se ha podido poner a punto, el producto final es imposible de ser detectado por espectroscopía de masas (MS) y debido esto la caracterización del conjugado no se ha podido realizar. Como consecuencia d'este problema se decidió abandonar esta estrategia. El segundo sistema posible, *conjugados de PEG-GLA*, el método de conjugación de unidades de PEG a GLA se ha logrado satisfactoriamente. Asimismo, también se ha logrado la funcionalización de estos sistemas con tres péptidos directores diferentes (RGD, P25 y P87). Finalmente, todos los sistemas

obtenidos se han conjugado satisfactoriamente con α -GLA o Replagal (enzima terapéutica comercial de Shire que se administra a pacientes actualmente).

- Obtención de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con péptido director RGD cargadas de GLA. El grupo Nanomol ha sido capaz de preparar SUV compuestas por colesterol, DPPC y Cholesterol-RGD como un péptido diana (ratio 6: 10: 1), con α -GLA o Replagal comercial incorporados en las vesículas. Se ha demostrado con éxito que la preparación de estas SUV por el método DELOS-SUSP es óptimo, obteniéndose lotes de SUV-RGD-GLA y/o nanoconjugados SUV-RGD-Replagal®. Estos nanoconjugados son de tamaño de partícula homogéneo (entre 100-200 nm), con una buena estabilidad en el tiempo y una alta homogeneidad y unilamellaridad. La eficiencia de encapsulación de la GLA/Replagal dentro de las SUV también se ha determinado (a través de Western-blot) y resultó estar alrededor del 30% de eficiencia. Finalmente, las formulaciones resultaron ser no citotóxicas, no hemolíticas y estériles.

- Obtención de *complejos de polielectrolitos de chitosano (PEC)* funcionalizados con péptido director RGD y cargados con GLA. La producción de PEC cargados con GLA se ha logrado con un procedimiento reproducible, así como se ha demostrado también la idoneidad del sistema para poder ser sometido a procesos de liofilización. El protocolo de liofilización adecuado definido asegura la larga estabilidad de los PEC y permite la concentración de los mismos en la muestra, necesaria para los experimentos *in vivo*.

3) Evaluación de la internalización y de la actividad *in vitro* de los diferentes DDS en modelos de células de Fabry.

Ensayos de internalización: en el caso de los sistemas de PEGilados (unidos a un fluorocromo, en este caso) se demostró por citometría de flujo y técnicas de microscopía confocal que los sistemas PEG-P25 PEG-RGD tenían una mayor capacidad para atravesar las membranas celulares MAEC KO que el resto de nanoconjugados PEG evaluados. Además, se demostró que ambos sistemas se acumulan en los lisosomas. En el caso de los nanoconjugados SUV-RGD y SUV-RGD-GLA, la internalización de los mismos en las células se demostró por microscopía confocal de barrido, microscopía TIRF y técnicas de citometría de flujo. Finalmente, en el caso de la PEC-RGD, la internalización en las células HMEC-1 también se demostró utilizando técnicas de citometría de flujo.

Ensayos *in vitro* de actividad: la eficacia de los diferentes sistemas de DDS, cargados de α -GLA o enzima comercial (Replagal), fue probada en cultivos primarios

derivados de la aorta de ratones Fabry KO (células MAEC). La actividad de los tres sistemas DDS se ensayó usando el ensayo NBD-Gb3. Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima α -GLA para reducir la acumulación celular de una Gb3 marcada con fluorescencia, es decir, NBD-Gb3 (*trihexosid N-docecanoyl-NBD-ceramide*). Esta actividad solo se produce a pH bajo, dentro del compartimento lisosomal de la célula y, por tanto, la reducción NBD-Gb3 refleja la internalización final en el lisosoma de la enzima GLA, así como su actividad en dicho compartimento. De este modo, se demostró que en el caso de los sistemas de PEGilados cargados con GLA o Replagal, la actividad de estos sistemas es ligeramente peor que la de la enzima GLA y/o Replagal libre. Sin embargo, se ha demostrado que la adición del péptido director RGD al sistema PEGilado puede mejorar significativamente su actividad, ya que revierte el efecto de la PEGilación. Por tanto, estos resultados confirman también que la adición de un péptido de direccionamiento (específicamente el péptido RGD) puede mejorar significativamente la internalización de los sistemas DDS (y, de este modo, la actividad enzimática final del enzima encapsulado en ellos). De la misma forma, se ha demostrado que en el caso de los sistemas de PEC, la actividad enzimática de la α -GLA es mayor cuando se entrega encapsulada dentro del complejo con los PEC que en formato de enzima libre, observándose una mayor reducción de los niveles de Gb3 en la célula cuando éstas son incubadas con PEC-GLA. Finalmente, en el caso del sistema de las SUV-RGD cargadas con GLA o Replagal se demostró que el sistema de RGD-SUV-GLA tiene un mejor rendimiento con respecto a la actividad enzimática de la enzima libre.

4) Estudios de toxicidad y biodistribución *in vivo* de los distintos DDS cargados con GLA en modelos de ratones de Fabry.

Toxicidad *in vivo*. El propósito de este objetivo es demostrar el perfil de toxicidad de los diversos DDS. Se ha estudiado la citotoxicidad y hemocompatibilidad de los diferentes sistemas (enzima desnudo, PEC [dirigidos con y sin RGD] y SUV [dirigidos o no con RGD]). Los resultados mostraron que no se observaron signos de toxicidad después de 72 horas de incubación de células HeLa y HMEC-1. La viabilidad celular se mantiene por encima de 80% en todos los casos. Por otra parte, no se observó tampoco una hemólisis significativa.

Ensayos de biodistribución: se han realizado ensayos de PK/PD con el sistema RGD-SUV, junto con el mismo ensayo con enzima GLA libre o Replagal. La razón para seleccionar el sistema RGD-SUV para el ensayo (y no otro DDS) es que el sistema RGD-SUV es el más avanzado desde el punto de vista químico (caracterización,

producción de patentes, proceso de purificación ...), y es el que presenta mejores resultados *in vitro* (ensayo NBD-Gb3). Los resultados, aunque preliminares, indican claramente que la vida media de la enzima (en este caso, la comercial, Replagal) se ve incrementada significativamente cuando se administra conjugado al sistema SUV-RGD. Estos resultados sugieren además que la actividad *in vivo* de RGD-SUV-Replagal podría ser significativamente mejor que la actividad de la enzima libre.

5) Estudios de eficacia de DDS cargados con GLA en ratones Fabry. Reducción de los niveles de Gb3 *in vivo*.

El objetivo de esta actividad es proporcionar una buena prueba de concepto de que los DDS son capaces de entregar la enzima GLA, manteniéndose este activo, en el compartimiento lisosomal de las células endoteliales y restaurar así la actividad de la GLA en los ratones KO Fabry. Para ello, se realizaron varias tareas a lo largo del proyecto, específicamente: i) el desarrollo de un método de detección de niveles de Gb3 cuantitativo en plasma y muestras de tejido (riñón, bazo, y el hígado). En el origen del proyecto se esperaba poder establecer un método para la cuantificación de LysoGb3, pero a lo largo del proyecto se descartó porque no se alcanzaban los límites de detección del HPLC utilizado. Por lo tanto, se decidió determinar los niveles de Gb3 extraídos de los ratones WT y KO Fabry por un método de HPTLC. Durante este último período diferentes tipos de tejidos y el plasma de ratones WT y KO Fabry se han estudiado con el fin de establecer las condiciones de análisis y puesta en marcha de la metodología. Esto ha permitido confirmar que los niveles de Gb3 en los tejidos de los ratones KO son más altos que los de los ratones WT. Aunque el método está casi validado, tienen que realizarse más experimentos para confirmar los hallazgos.

3. Relevancia de los resultados finales obtenidos y sus posibles implicaciones clínicas

Desde el punto de vista científico, el uso potencial de nanotransportadores para transportar efectivamente una enzima terapéutica activa a los lisosomas endoteliales representa un desafío relevante. Por una parte, se requiere la cooperación de varios grupos y expertos científicos de distintos ámbitos, como son la ingeniería química, la biología molecular, bioquímica, biotecnología, farmacología, así como un buen conocimiento biomédico y clínico. Por lo tanto, la creación de un consorcio multidisciplinar es necesario, como supone esta propuesta, si se quiere tener alguna

probabilidad de éxito. Por otra parte, todavía se requiere mucha información acerca de los procedimientos que tienen que ser implementados en relación con la síntesis química de los sistemas de administración de fármacos (DDS) previstos en el proyecto, así como su validación *in vitro* e *in vivo*. En este contexto, nuestro proyecto ha contribuido sin duda a mejorar el conocimiento de los grupos involucrados en la metodología química relacionada con DDS. Por otra parte, también ha proporcionado al campo de la biomedicina y de la nanotecnología nuevos datos experimentales sobre modelos celulares y animales para validación preclínica de nuevos sistemas DDS. Todos estos aspectos son cruciales para la futura traslación a la clínica, así como a la transferencia de la propiedad intelectual desarrollada en el marco del proyecto. Hay que señalar que en el transcurso de este proyecto se han otorgado dos patentes, y una de ellas ya ha sido transferida a la industria. Además, la continuación de este proyecto está garantizada, ya que el grupo de coordinación (VHIR) y socios Nanomol-CSIC e IBB-UAB continúan el trabajo desarrollado en este proyecto dentro del marco de dos proyectos adicionales, TERARMET (ref: RTC-2014-2207 -1; de 01/11/2014 a 31/12/2017, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad bajo el programa Retos-Colaboración del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, y LIPOCELL (cofinanciado por CIBER-BBN y Praxis biofarmaceuticals). Específicamente, el nuevo candidato para nanomedicina para FD, se pondrá a prueba a nivel regulatorio preclínico en el proyecto del programa de transferencia del CIBER-BBN, LIPOCELL. La ampliación de la producción de este nueva nanodroga bajo buenas prácticas de manufactura (GMP) se llevará a cabo bajo en el proyecto TERARMET.

Debe mencionarse asimismo que debido a que las enfermedades raras tienen una baja incidencia en la población general (definida como inferior a 1/10.000 personas) el desarrollo de tratamientos específicos plantea preguntas relacionadas con los potenciales beneficios de explotación para el mercado farmacéutico. Sin embargo, en este proyecto específico hemos tenido éxito en la transferencia de resultados a la industria (patentes transferidas a Praxis biofarmaceuticals) e incluso tenemos la posibilidad de asociarnos con Shire (productor de uno de los dos tratamientos actuales disponibles para los pacientes FD, Replagal), ya que están interesados en participar en nuestro proyecto LIPOCELL.

4. Bibliografía científica generada

I Cabrera, E. Elizondo, O. Esteban, J.L. Corchero, M. Malgarejo, D. Pulido, A. Córdoba, E. Moreno, U. Unzueta, E. Vázquez, I. Abásolo, S. Schwartz Jr., A. Villaverde, F. Albericio, M. Royo, M.F. García-Parajo, N. Ventosa, J. Veciana.

Multifunctional nanovesicle-bioactive conjugates prepared by a one-step scalable method using compressed fluids.

Nano Letters., 13(8), 3766-3774 (2013).

I Cabrera, I. Abásolo, J.L. Corchero, E. Elizondo, P. Rivera, S. Sala, M. Rivas, M. Malgarejo, D. Pulido, M. Royo, F. Albericio, A. Villaverde, M.F. García-Parajo, S. Schwartz Jr, N. Ventosa, J. Veciana.

α -Galactosidase A loaded nanoliposomes with enhanced enzymatic activity for Fabry's disease

Nano Letters (en revisión).

JL. Corchero, E. Vázquez, E. García-Fruitos, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde.

Recombinant protein materials for bioengineering and nanomedicine.

Nanomedicine 9(18): 2817-2828, (2014).

E. Rodríguez-Carmona, R. Mendoza, E. Ruiz-Cánovas, N. Ferrer-Miralles, I. Abásolo, S. Schwartz, A. Villaverde, JL. Corchero.

A novel bio-functional material based on mammalian cell aggresomes.

Acta Biomaterialia (en revisión, 2015).

L. Ferrer-Tasies, E. Moreno-Calvo, M. Cano-Sarabia, M. Aguilera-Arzo, A. Angelova, S. Lesieur, S. Ricart, J. Faraudo, N. Ventosa, J. Veciana.

Quatsomes: vesicles formed by self-assembly of sterols and quaternary ammonium surfactants.

Langmuir, 29 (22), 6519-6528. (2013).

JL. Corchero, R. Mendoza, J. Lorenzo, V. Rodríguez-Sureda, C. Domínguez, E.

Vázquez, N. Ferrer-Miralles, A. Villaverde.

Integrated approach to produce a recombinant, His-tagged human α -galactosidase A in mammalian cells.

Biotechnol. Prog. 2011. 27(5):1206-17.

N. Ventosa.

Materiales moleculares nanoestructurados en el desarrollo de nuevos fármacos.

SEBBM. 2011. 168.

F. Temelli, A. Córdoba, E. Elizondo, M. Cano-Sarabia, J. Veciana, N. Ventosa.

Phase behaviour of phytosterols and cholesterol in carbón dioxide-expanded etanol.

J. of Supercritical Fluids. 2012. 63, 59.

E. Elizondo, J. Larsen, N. S. Hatzakis, I. Cabrera, T. Bjornholm, J. Veciana, D. Stamou,

N. Ventosa.

Influence of the preparation route on the supramolecular organization of lipids in vesicular system.

J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 1918.

M. I. Gianotti, O. Esteban, M. Oliva, M.F. García-Parajo, F. Sanz.

pH-responsive polysaccharide-based polyelectrolyte complexes as nanocarriers for lysosomal delivery of therapeutic proteins.

Biomacromolecules 12, 2524-2533. (2011).

JL. Corchero, B. Gasser, D. Resina, W. Smith, E. Parelli, F. E. Vázquez, I. Abásolo, M.

Giuliani, J. Jäntti, P. Ferrer, M. Saloheimo, D. Mattanovich, S. Schwartz Jr., L Tutino,

A. Villaverde.

Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics.

Biotechnol. Adv. 2013. 31(2):140-53.