

# Projecte europeu «Smart-4-Fabry» per al desenvolupament d'una nova nanomedicina per al tractament de la malaltia de Fabry

## European "Smart-4-Fabry" project to develop a new nanomedicine for the treatment of Fabry disease

Judit Tomsen-Melero,<sup>1</sup> Elisabet González-Mira,<sup>1,2</sup> Nathaly Segovia,<sup>1,2</sup> Jaume Veciana<sup>1,2</sup> i Nora Ventosa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC)

<sup>2</sup> Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa (CIBER)

**Resum:** El projecte europeu «Smart-4-Fabry» té com a objectiu principal desenvolupar una nova nanomedicina, basada en l'encapsulació de l'enzim  $\alpha$ -galactosidasa A en nanoliposomes, per al tractament de la malaltia minoritària de Fabry. El projecte parteix d'una primera prova de concepte que dona suport a aquesta estratègia basada en la nanotecnologia, i té com a repte avançar amb la seva optimització fins al final de la preclínica reguladora. Aquest article presenta d'una manera general en què consisteix i com està organitzat el projecte a fi d'aconseguir aquesta fita. Per assolir reeixidament aquest objectiu, és necessària una estreta col·laboració entre equips de recerca de diferents disciplines científiques.

**Paraules clau:** Liposomes, nanomedicina, malaltia de Fabry, col·laboració interdisciplinària, desenvolupament de fàrmacs.

**Abstract:** The European "Smart-4-Fabry" project aims to develop a new nanoformulation based on the encapsulation of the  $\alpha$ -galactosidase A enzyme in nanoliposomes, to improve the current treatment of Fabry disease. The project will advance from the nano-GLA from a preliminary concept test to the end of the preclinical regulatory phase. This article presents this project and explains how it is organized to achieve its goal, a process that will require a strong multidisciplinary and cooperation between the participating research groups.

**Keywords:** Liposomes, nanomedicine, Fabry disease, interdisciplinary collaboration, drug development.

## Introducció a la malaltia de Fabry: deficiència de l'enzim $\alpha$ -galactosidasa A

Algunes malalties presenten una incidència molt baixa en la població (1 de cada 2 000 persones); són anomenades *malalties minoritàries*. Malgrat aquest nombre reduït, si es consideren en conjunt suposen una afectació del voltant del 7 % de tota la població mundial.

En concret, dins de les malalties minoritàries hi ha un grup de trastorns que s'engloben com a *malalties per dipòsit lisosòmic*, i són causades per una disfunció metabòlica en els lisosomes de les cèl·lules. Pertanyen a aquest grup les malalties de Fabry, Gaucher, Hunter i Sanfilippo, per a les quals actualment encara no s'ha trobat una cura definitiva. En general, aquests desordres són deguts a la manca de funcionament d'un sol enzim, necessari per al metabolisme de macromolècules com ara lípids, glicoproteïnes i mucopolisacàrids. La seva deficiència provoca l'acumulació de diferents substàncies no metabolitzades dins les cèl·lules [1].

Malgrat que encara no se n'ha trobat un tractament definitiu, moltes d'aquestes malalties són tractades mitjançant la teràpia de reemplaçament enzimàtic (*enzymatic replacement therapy*, ERT), que es basa en l'administració intravenosa de l'enzim deficient, normalment obtingut per biotecnologia recombinant. No obstant això, l'èxit d'aquest tipus de teràpia sol quedar limitat per la inestabilitat i la baixa eficàcia de l'enzim exogen que s'administra [2]. Per aquest motiu, la ciència continua buscant noves vies d'investigació i alternatives terapèutiques que millorin aquestes limitacions de l'ERT en totes les malalties minoritàries.

Concretament, en el cas de la malaltia de Fabry, aquesta alteració funcional és deguda a la falta de l'enzim  $\alpha$ -galactosidasa A (GLA), que provoca que alguns glicoesfingolípids (en particular, la globotriaosilceramida, Gb3) no es puguin degradar i s'acumulin als lisosomes de les cèl·lules endotelials de diversos òrgans (ronyons, cor, cervell, etc.). Els símptomes són molts: dolors a les extremitats, lesions cutànies, alteracions en la sudoració, vista frontal borrosa, problemes gastrointestinals, pèrdues d'oïda, etc. A llarg termini, acaba causant una vasculopatia generalitzada que pot provocar fallida renal, problemes al cor i afectació al sistema nerviós central (figura 1) [3].

Des de l'any 2001, a Europa està disponible el tractament de reemplaçament enzimàtic amb l'agalsidasa alfa (Replagal<sup>®</sup>,

Correspondència: Nora Ventosa  
Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC)  
Campus de la UAB, Bellaterra. 08193, Cerdanyola del Vallès  
Tel.: +34 935 801 853  
A/e: [ventosa@icmab.es](mailto:ventosa@icmab.es)

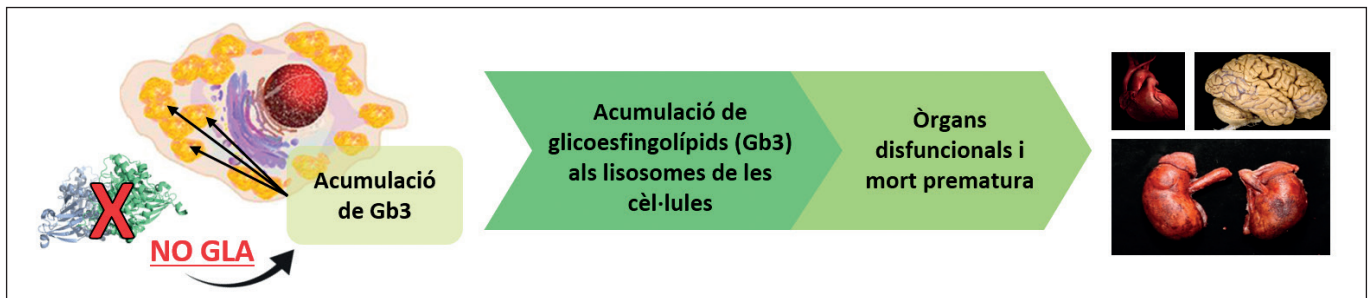


FIGURA 1. La malaltia de Fabry es basa en la deficiència de l'enzim GLA, que té com a funció metabolitzar lípids (en concret, Gb3) als lisosomes de les cèl·lules. Elaboració pròpia.

Laboratoris Shire, Irlanda) i l'agalsidasa beta (Fabrazyme®, Laboratoris Sanofi-Genzyme, EUA), dos fàrmacs orfes anàlegs a l'enzim deficitari causant de la malaltia. Ambdues molècules tenen la mateixa seqüència d'aminoàcids, i l'única diferència estructural entre elles és la de les cadenes laterals d'oligosacàrids [4]. Als Estats Units, l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (Food and Drug Administration, FDA) només va aprovar l'ús de l'agalsidasa beta, ja que, tenint en compte la legislació de fàrmacs orfes, només una de les dues molècules podia comercialitzar-se [5].

Globalment, aquest tipus de teràpia ERT ha demostrat efectes positius en la disminució dels cúmuls no desitjats de Gb3 en plasma i en alguns òrgans afectats, especialment el ronyó, amb la qual cosa restableix parcialment la patogènesi de la malaltia. No obstant això, aquesta estratègia presenta alguns desavantatges relacionats amb els aspectes següents: a) eficàcia limitada en pacients que es troben en un estat avançat de la malaltia; b) temps de semivida de l'enzim curt, a causa principalment del seu segrest per part del fetge i d'una presència important d'anticossos anti-GLA; c) cost elevat del tractament (280 000 €/pacient a l'any), ja que cal administrar repetidament una gran quantitat d'enzim i suposa un alt cost produir-lo; d) no creuament de la barrera hematoencefàlica (BHE), que descarta qualsevol possible reducció dels cúmuls de Gb3 al cervell.

## Objectiu de l'«Smart-4-Fabry»: de la prova de concepte fins a la preclínica reguladora

Una estratègia interessant per tractar de superar les limitacions dels tractaments d'ERT és el disseny i desenvolupament de noves nanoformulacions a fi d'augmentar l'estabilitat i l'efi-

càcia dels enzims terapèutics, com la GLA. Actualment s'estan emprant amb èxit diferents tipus de nanoestructures per millorar el subministrament d'actius i biomolècules terapèuticament actives (*drug delivery systems*). Una de les nanoestructures més emprades són els sistemes nanovesiculars, especialment els sistemes liposòmics, que han mostrat resultats favorables tant en estudis *in vitro* com *in vivo* [6].

Els liposomes, vesícules formades per una o més bicapes lipídiques concèntriques que separen un compartiment aquós de la resta del medi, són un dels sistemes supramoleculars més prometedors per ser utilitzats com a transportadors d'actius terapèutics. La seva àmplia funcionalitat és determinada per una gran versatilitat respecte a la mida, la composició, les característiques superficials i la capacitat de modificació. A més, des del punt de vista farmacològic, solen presentar una bona compatibilitat, biodegradació i baixa toxicitat [7]. En concret, els liposomes que tenen una mida aproximada de 100 nm desperten un major interès en el camp de l'alliberament de fàrmacs, ja que són prou grans per evitar una primera eliminació a través dels ronyons, però a la vegada són suficientment petits per evitar el seu segrest per part del sistema fagocític, cosa que incrementa el seu temps de circulació en sang i, per tant, potencia la possibilitat d'arribar als òrgans i cèl·lules diana i alliberar l'actiu.

La suma d'aquests factors ha motivat el desenvolupament de sistemes liposòmics en l'àmbit de la salut, i fins i tot ha donat lloc als primers productes basats en nanomedicina, aprovats per les agències reguladores i ja presents en la pràctica clínica (taula 1).

No obstant això, un dels obstacles principals a l'hora de transferir les formulacions nanoliposòmiques a la clínica és la complexitat dels mètodes actuals per a la seva preparació i el poc control que aquests mètodes ofereixen sobre l'assemblatge

TAULA 1. Fàrmacs basats en liposomes que hi ha al mercat actualment. Adaptat de [8].

Nom del producte	Fàrmac	Indicació	Ruta d'administració	Dimensions a la nanoescala
Ambisome	amfotericina B	infeccions fúngiques	intravenosa	45-80 nm
Amphocil	amfotericina B	infeccions fúngiques	intravenosa	110-114 nm
DaunoXome	citrat de daunorubicina	sarcoma de Kaposi	intravenosa	45 nm
DepoCyt	citarabina	meningitis limfomatosa	intravenosa	20 nm
Doxil	doxorubicina	sarcoma de Kaposi	intravenosa	87 nm
Visudyne	verteporfina	sensibilitzador en teràpia fotodinàmica	intravenosa	100 nm
Evacet	doxorubicina	càncer d'ovari	intravenosa	150 nm
Lipo-Dox	doxorubicina	tumors sòlids	intravenosa	20 nm
Epaxal	virus inactivat d'hepatitis A (soca RG-SB)	hepatitis A	intramuscular	—
Inflexal	hemaglutinina inactivada de soques de virus de la grip A	Grip	intramuscular	—

dels diferents components moleculars que les constitueixen. Així doncs, avui dia encara és un repte obtenir sistemes nanoliposòmics per a ús mèdic amb les característiques fisicoquímiques i la qualitat que requereixen les agències reguladores del medicament. Cal desenvolupar nous processos per obtenir nanovesícules lipídiques a gran escala, amb una reproductibilitat elevada, puresa i un cost baix, que compleixin els requeriments reguladors —l'Agència Europea del Medicament (European Medicines Agency, EMA) i l'FDA— i que permetin completar els estudis de seguretat i toxicologia preclínic, així com totes les fases clíniques. En el projecte «Smart-4-Fabry» s'utilitza una prometedora plataforma tecnològica anomenada DELOS-SUSP (de l'anglès *depressurization of an expanded liquid organic solution-suspension*) [9, 10] per a l'encapsulació, amb una sola etapa de procés, de l'enzim GLA en nanoliposomes (figura 2). Aquesta tecnologia basada en l'ús de gasos comprimits —com, per exemple, el CO<sub>2</sub>— permet obtenir sistemes vesiculars —com ara sistemes liposòmics—, de mida nanoscòpica i amb una elevada homogeneïtat morfològica entre les unitats nanovesiculars. A més, el procés DELOS-SUSP ha mostrat una bona reproductibilitat de lot a lot i la capacitat per preparar, amb àcid guanílic (GMP), quantitats suficients (fins al litre) de formulacions nanovesiculars per realitzar assaigs clínics.

Mitjançant aquesta tecnologia, en els últims anys el nostre grup ha estat investigant el desenvolupament d'un nou sistema liposòmic que millori el transport intracel·lular de la GLA subministrada exògenament i altres propietats farmacològiques d'aquest enzim, i que permeti obtenir una teràpia per a

la malaltia de Fabry millor que les actuals [9, 10]. L'encapsulació de l'enzim GLA en nanoliposomes pot aportar bàsicament dues millores al tractament per ERT de la malaltia de Fabry: 1) increment de l'eficàcia *in vivo* gràcies a la protecció del nanoliposoma contra la degradació de l'enzim GLA durant el temps de circulació en sang, i 2) capacitat per crear barres biològiques (per exemple, membrana cel·lular, barrera hematoencefàlica), que l'enzim per si sol no és capaç de traspasar, i accedir als dipòsits no desitjats de glicoesfingolípids per a la seva reducció.

La membrana del sistema liposòmic desenvolupat per a la protecció i el transport de l'enzim GLA està formada bàsicament per tres components moleculars lipídics: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (col) i colesterol funcionalitzat amb el pèptid RGD (arginina-glicina-àcid aspàrtic) a través d'una cadena de polietilenglicol (col-PEG-RGD).

Els nous liposomes nano-GLA protegeixen l'enzim GLA i en redueixen la degradació i la immunogenicitat, incrementen el temps de semivida en sang i permeten una millor biodistribució per tot el cos. A més, els nanoliposomes es troben funcionalitzats amb el pèptid RGD, unit covalentment a les molècules de colesterol presents en la membrana lipídica del liposoma a través d'una cadena de polietilenglicol (PEG) (figura 3). La funció del pèptid RGD és augmentar l'afinitat dels nanoliposomes per a les cèl·lules endotelials, molt afectades per la malaltia de Fabry. En els pacients Fabry, les cèl·lules endotelials tenen una sobreexpressió d'integrines  $\alpha v \beta 3$  a la part exterior de la membrana cel·lular. El pèptid RGD té una gran

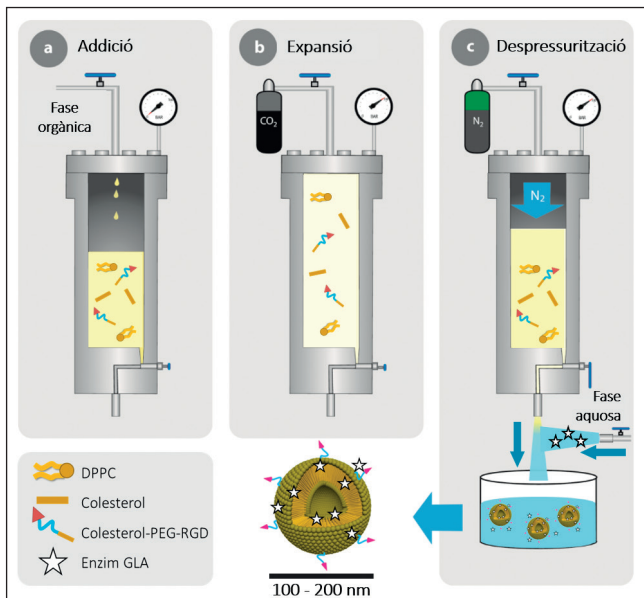


FIGURA 2. Esquema del procés DELOS-SUSP per a la preparació de nanoliposomes amb enzim GLA: a) càrrega, a pressió atmosfèrica, del reactor amb una solució orgànica dels components moleculars de la membrana liposòmica (DPPC, colesterol, colesterol-PEG-RGD); b) addició del CO<sub>2</sub> comprimit per produir una solució expandida amb tots els components de membrana dissolts, a la pressió de treball (10 MPa); c) despressurització de la solució expandida sobre una solució aquosa que conté l'enzim lliure GLA, a fi de produir els nanoliposomes de GLA (nano-GLA). Adaptat de [10].

afinitat per aquest tipus de receptors cel·lulars, i, mitjançant la funcionalització dels nanoliposomes amb RGD, es pretén afavorir el transport i el subministrament de la GLA a les cèl·lules endotelials. En estudis previs del grup, es va corroborar que els nanoliposomes que contenen el pèptid RGD presentaven una internalització cel·lular trenta vegades superior que els nanoliposomes sense pèptid a la seva superfície. A més a més, es va observar que la conjugació de la GLA als nanolipo-

somes, mitjançant interaccions no covalents, també n'augmentava l'activitat enzimàtica, a causa de la immobilització de la proteïna quan interacciona amb la membrana del nanoliposoma, cosa que suggereix una millor exposició del centre actiu de l'enzim [10].

El desenvolupament dels nanoliposomes de GLA es va iniciar en el marc d'un projecte de col·laboració interdisciplinari, finançat per la xarxa CIBER-BBN (Centre de Recerca Biomèdica en Xarxa - Biotecnologia, Biomaterials i Nanomedicina) [12] i per la Fundació Marató de TV3 [13]. La col·laboració de quatre grups de recerca amb àrees d'investigació complementàries, adscrits al CIBER-BBN, va ser clau per arribar a la prova de concepte, actualment protegida amb una patent internacional i la llicència de la qual la té l'empresa Biopraxis [14]: el grup Drug Delivery & Targeting del Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), especialistes en l'avaluació *in vitro* i *in vivo* de nanomedicines; la Unitat de Química Combinatòria del Parc Científic de Barcelona (PCB), especialistes en el disseny i síntesi de pèptids; el grup Nanobiotechnology de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), especialistes en el disseny i síntesi de proteïnes recombinants; i el nostre grup Nanomol, de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona del CSIC, especialistes en el disseny i la síntesi de materials moleculars per al desenvolupament de nanomedicines. En el marc del projecte Lipocell (finançat per l'empresa Biopraxis i el consorci CIBER-BBN) i el projecte Terarmet (finançat pel Ministeri d'Economia i Empresa), es va avançar en els estudis preclínic no reguladors. El 2016, la Comissió Europea va concedir el projecte «Smart-4-Fabry», de quatre anys de durada i amb un pressupost de

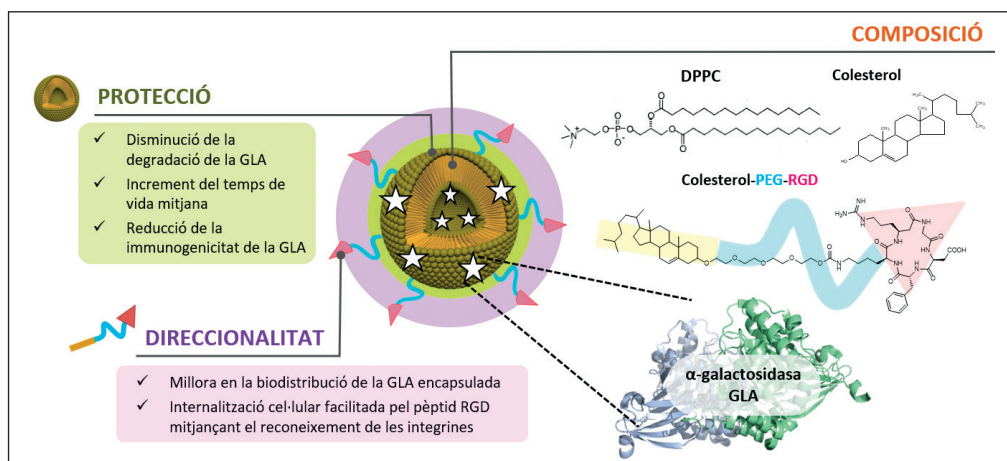


FIGURA 3. Els nanoliposomes aporten dues funcions principals: protecció i direccionalitat. Estan compostos pel fosfolípid DPPC, colesterol i el pèptid RGD unit a una part de les unitats de colesterol a través d'una cadena de PEG. Elaboració pròpia.

TAULA 2. Objectius específics del projecte «Smart-4-Fabry» i mesura de l'èxit. Elaboració pròpia.

	Objectiu	Mesura de l'èxit
1	Aconseguir un control de qualitat en l'autoassemblatge dels components moleculars que formen la nano-GLA, així com en les seves característiques fisicoquímiques.	Procés de fabricació per a la producció de la nano-GLA amb criteris d'especificacions de qualitat.
2	Proporcionar un estudi complet d'eficàcia, farmacocinètica i toxicitat preclínica per a la formulació final de nano-GLA (nano-GLA-v4).	Resultats en assaigs de seguretat de la nano-GLA per suportar els requeriments reguladors necessaris abans d'iniciar els primers estudis clínics amb humans.
3	Desenvolupar una nano-GLA capaç de creuar la barrera hematoencefàlica (BHE).	Resultats positius de la nano-GLA en proves de microperfusió de flux obert cerebral (cOFM), tècnica que permet l'estudi del creuament a través de la BHE.
4	Construir una planta pre-GMP per a la producció de les quantitats necessàries de nano-GLA-v4 per als estudis preclínics d'eficàcia (no-GLP) i de toxicologia (GLP).	Producció del primer lot de nano-GLA-v4 amb els requeriments apropiats de quantitat i qualitat per completar els estudis preclínics.
5	Desenvolupar una formulació de nano-GLA seguint els requeriments de la indústria farmacèutica i de les autoritats reguladores.	Implementació de presa de decisions de projecte «go/no-go» d'acord amb les directrius reguladores de l'EMA.
6	Crear un pla d'explotació i model de negoci realista basat en l'experiència de les empreses del mercat de malalties minoritàries, per tal d'assegurar la translació dels resultats del projecte als pacients de Fabry.	Pla de negocis consolidat i estratègia d'explotació per a la nanoformulació obtinguda.

5,8 milions d'euros, el qual té com a objectiu principal l'optimització del sistema liposòmic nano-GLA per obtenir una versió final de la nanoformulació (nano-GLA-v4), amb la qualitat, seguretat i eficàcia requerides per poder iniciar assaigs clínics amb humans. Aquesta nova nanoformulació de l'enzim GLA ha de permetre un increment en l'eficàcia del tractament de la malaltia de Fabry, per reemplaçament enzimàtic, en comparació amb l'actual que existeix amb GLA no nanoformulada. Aquest guany en eficàcia permetria l'ús d'una dosi clínica més petita i/o espaiar la pauta posològica actual. El benefici final podria comportar una reducció considerable del cost del tractament de la malaltia de Fabry, i, sobretot, una millora substancial en la qualitat de vida d'aquests pacients.

Per aconseguir l'objectiu principal del projecte «Smart-4-Fabry», cal assolir els sis objectius específics, resumits en la taula 2, on també s'indica com es mesurarà l'assoliment.

## L'equip per realitzar el projecte «Smart-4-Fabry»

Per aconseguir aquests objectius, és necessària l'aportació de coneixement de diferents disciplines, tant dels àmbits acadèmic com empresarial. Per aquest motiu, el consorci del projecte està format per deu equips de treball de cinc institucions de recerca públiques i cinc empreses privades, que aporten l'expertesa necessària en nanotecnologia, caracterització fisicoquímica, avaluació biològica *in vitro* i *in vivo*, escalat en la

producció de nanoestructures i desenvolupament farmacèutic sota les directrius de les agències reguladores, per dur a terme el pla de treball del projecte (taula 3).

TAULA 3. Consorci del projecte «Smart-4-Fabry», format per deu socis que inclouen centres de recerca i empreses de cinc països diferents. Elaboració pròpia.

Soci	País	Institució	Àrea de coneixement
	Espanya	xarxa de recerca	nanotecnologia i biomedicina
	Israel	centre de recerca	caracterització fisicoquímica de nanoestructures
	Dinamarca	centre de recerca	caracterització fisicoquímica de nanoestructures
	Àustria	centre de recerca	avaluació del creuament de barrera hematoencefàlica
	Espanya	empresa farmacèutica	producció amb GMP i desenvolupament de tractaments per a malalties rares
	Espanya	petita empresa	nous processos de producció de nanoliposomes
	Àustria	xarxa de recerca	anàlisi de riscos i seguretat, de productes i processos en nanomedicina
	Espanya	petita empresa	desenvolupament farmacèutic i regulació
	Regne Unit	gran empresa	assaigs de preclínica reguladora
	Espanya	petita empresa	desenvolupament de proteïnes terapèutiques

## Organització i paquets de treball del projecte «Smart-4-Fabry»

El pla de treball per assolir els objectius del projecte està organitzat en onze paquets de treball (*work packages*, WP), relacionats entre si, tal com està esquematitzat en la figura 4.

### WP0. Producció de l'enzim GLA

Aquest paquet de treball té com a objectiu principal el desenvolupament d'un procés de producció basat en la transfecció estable per obtenir d'una manera eficient l'enzim GLA, que no tingui cap limitació productiva ni legal per arribar a la clínica. En el marc d'aquest paquet de treball també es produeixen les quantitats necessàries de GLA, de qualitats diferents, per al desenvolupament de la nanoformulació liposòmica nano-GLA.

### WP1. Nanoformulació de GLA en nanoliposomes multifuncionals

Aquest paquet de treball té l'important objectiu d'optimitzar la nanoformulació de GLA inicial, anomenada *nano-GLA-v1* i

punt de partida del projecte, per aconseguir un prototip final, que anomenarem *nano-GLA-v4*, amb unes característiques fisicoquímiques i biològiques òptimes per completar un avançat paquet d'estudis preclínic (no reguladors i reguladors) que doni suport al futur desenvolupament clínic de la nano-GLA.

Per això cal millorar atributs crítics de qualitat, com ara augmentar l'estabilitat col·loidal del sistema, disminuir la polidispersivitat, augmentar l'eficiència d'encapsulació de la GLA en els nanoliposomes i aconseguir una concentració total de GLA major en el sistema nanoliposòmic que permeti les dosificacions requerides en els assaigs *in vivo* preclínic. En la figura 5 es troben representades les diferents estratègies per optimitzar els nanoliposomes de GLA del projecte «Smart-4-Fabry». Per exemple, en el marc d'aquest paquet es desenvolupen nanoliposomes amb cadenes de PEG de llargada diversa per unir el pèptid RGD al colesterol, i nanoliposomes amb diferent densitat del pèptid RGD a la seva superfície, per arribar a una nanoformulació liposòmica amb unes característiques superficials òptimes. El prototip final serà el resultat d'aquesta optimització i tindrà la qualitat requerida i apropiada per completar els estudis preclínic no reguladors (WP4) i reguladors (WP5).

A més, en aquest paquet de treball també s'exploren altres pèptids alternatius a l'RGD, a fi d'estudiar l'impacte d'aques-

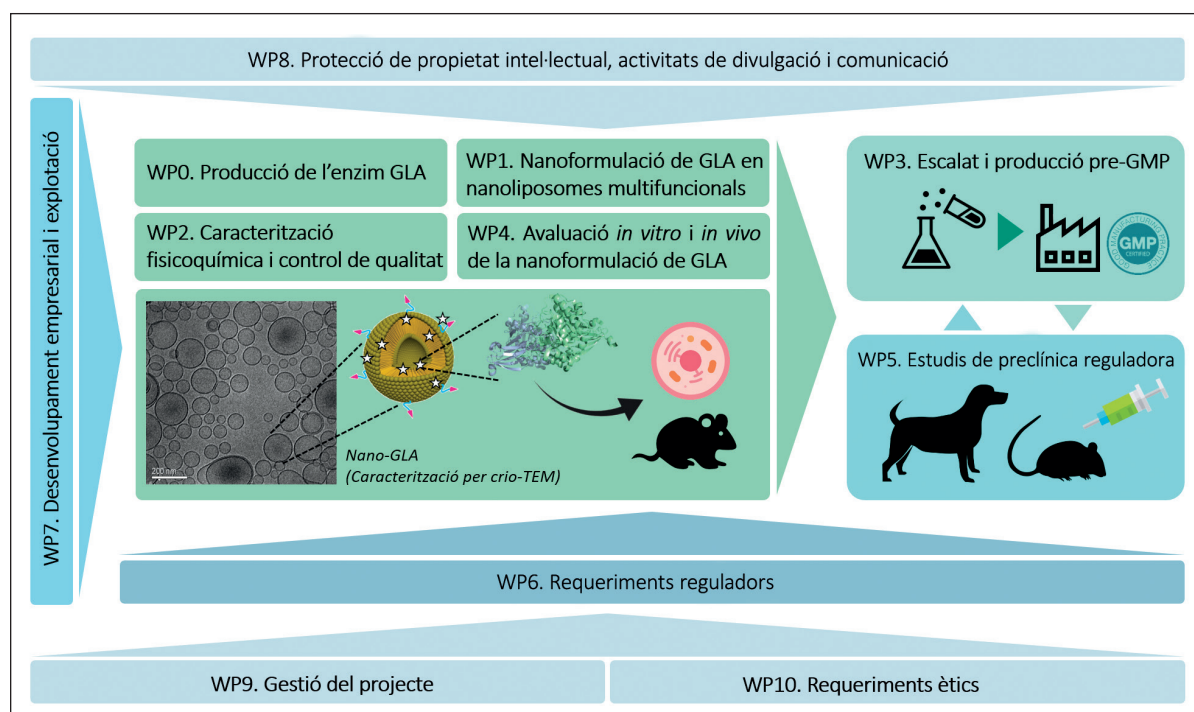


FIGURA 4. Interacció entre els diferents WP del projecte «Smart-4-Fabry». Elaboració pròpia.

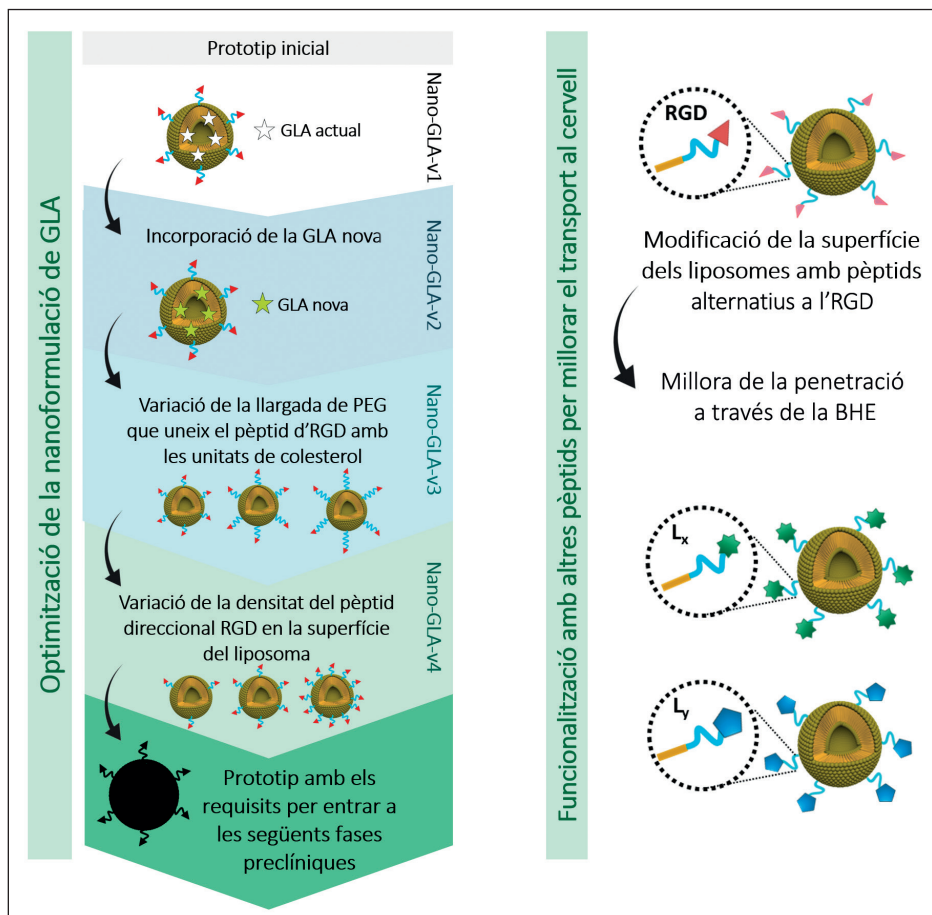


FIGURA 5. Les tasques del WP1 es divideixen principalment en dos objectius: 1) optimització de la nanoformulació de GLA de la versió 1 a la versió 4 per assolir els requisits necessaris amb vista a avançar-la cap a les fases clíniques, i 2) preparació de liposomes amb altres lligands per millorar el creuament de la barrera hematoencefàlica. Elaboració pròpia.

tes modificacions de la superfície dels nanoliposomes en el creuament de barreres biològiques, com la BHE.

## WP2. Caracterització fisicoquímica i control de qualitat

Aquest paquet s'encarrega de la caracterització fisicoquímica de la nano-GLA, a fi d'establir correlacions entre les característiques estructurals de la nanoformulació i la seva eficàcia biològica. S'empren metodologies ben establertes per a la caracterització detallada i estadística d'aquests sistemes en els nivells molecular, supramolecular i nanoscòpic, per tal de poder dissenyar protocols de control de qualitat. Mitjançant la tècnica de criomicroscòpia electrònica (crio-TEM) es realitza l'observació directa de la morfologia i la mida dels nanoliposomes. La composició química de les nanoformulacions es de-

termina amb tècniques de cromatografia de líquids d'alta pressió (*high-efficiency liquid chromatography*, HPLC). La distribució de mida dels nanoliposomes de les diferents formulacions es caracteritza bàsicament per dues tècniques de dispersió de llum: la dispersió dinàmica de la llum i la dispersió de raigs X d'angle petit. Aquesta darrera ens dona informació estadística de la morfologia dels liposomes (per exemple, gruix de la membrana, nombre de lamelles en els liposomes, etc.). Mitjançant tècniques de microcalorimetria, es determinen la naturalesa i la intensitat de les interaccions intermoleculars entre els diferents components dels nanoliposomes de GLA.

Un objectiu important d'aquest paquet de treball és la definició dels atributs crítics de qualitat i de les seves especificacions que permetin garantir la reproductibilitat de lot a lot i durant el procés d'escalat.

### WP3. Escalat i producció pre-GMP

L'objectiu principal d'aquest paquet de treball és dissenyar i construir una planta pilot que permeti escalar el procés de producció DELOS-SUSP, desenvolupat a escala del laboratori, dels nanoliposomes de nano-GLA. En el marc d'aquest paquet de treball es determinen els marges dels paràmetres de procés, dins dels quals es produeix nano-GLA amb els atributs crítics de qualitat desitjats i establerts en el WP2. Aquest WP també s'encarrega de validar que la tecnologia de producció de la nano-GLA pugui ser implementada sota la normativa de bones pràctiques de fabricació, requerida per a la producció de lots de nano-GLA per a assaigs clínics.

### WP4. Avaluació 'in vitro' i 'in vivo' de la nanoformulació de GLA

L'objectiu d'aquest WP és testar *in vitro* i *in vivo* les nanoformulacions de GLA obtingudes en els paquets de treball WP1 i WP3, per avaluar-ne l'eficàcia, la farmacocinètica, la biodistribució, la toxicitat preliminar i la capacitat de creuar la BHE. S'utilitzen models cel·lulars i animals en què s'ha eliminat el gen que codifica l'enzim GLA i s'obtenen sistemes *knock-out* (KO) que mimetitzen els efectes de la malaltia de Fabry. Això permet estudiar l'impacte de les variacions estructurals dels nanoliposomes de GLA (variacions en els components de membrana, en la densitat de pèptid a la superfície del nanoliposoma, en la concentració de l'enzim GLA, etc.) sobre la seva capacitat de creuar barreres biològiques —membrana cel·lular i barrera hematoencefàlica—, l'activitat enzimàtica *in vitro* i *in vivo* i poder seleccionar la millor formulació de nano-GLA candidata a entrar als assaigs de seguretat i toxicologia de preclínica reguladora.

### WP5. Estudis de preclínica reguladora

L'objectiu d'aquest paquet de treball és avaluar la seguretat de la nanoformulació a través d'estudis toxicològics i farmacològics *in vivo*, emprant una espècie rosegadora (la rata) i una de no rosegadora (el gos) com a animals model per assegurar que el producte compleix tots els requeriments de seguretat necessaris per entrar a les fases clíniques amb persones.

### WP6. Requeriments reguladors

La principal missió d'aquest paquet de treball és assegurar que els assaigs per avaluar l'eficàcia i la toxicologia dels nanoliposomes nano-GLA es realitzen d'acord amb les directrius reguladores de l'EMA. A través del procediment del *scientific advice*, s'ha obtingut assessorament de l'EMA sobre aspectes de qualitat i de preclínica per donar suport al futur desenvolupament clínic de la nano-GLA.

### WP7. Desenvolupament empresarial i explotació

Les tasques d'aquest paquet de treball estan centrades en la implementació d'un pla de negoci detallat, i en l'avaluació de les novetats de l'estudi de mercat ja desenvolupat a l'inici del projecte. S'hi inclouen la identificació de resultats clau explotables, a mesura que es van generant; la gestió dels drets de propietat intel·lectual; l'avaluació del mercat; l'avaluació del cost del procés de producció i dels productes obtinguts; el full de ruta de comercialització, o l'avaluació de riscos, entre d'altres.

### WP8. Protecció de propietat intel·lectual, activitats de divulgació i comunicació

Aquest paquet de treball s'encarrega de gestionar la difusió dels resultats que es van obtenint durant la realització del projecte a un ampli ventall de públics, tant a la comunitat científica com al públic en general. Abans de la seva difusió, en el marc d'aquest paquet de treball, s'avalua la possibilitat i interès de protegir els resultats generats a través de patents. Els mitjans de comunicació que s'empen són la pàgina web del projecte (<http://smart4fabry.eu>), revistes científiques, congressos internacionals, Twitter, premsa local, participació en iniciatives de divulgació científica, etc.

### WP9. Gestió del projecte

Tal com indica el nom, les tasques d'aquest paquet de treball estan relacionades amb la creació d'un marc de gestió adequat, que enllaci tots els components del projecte i permeti la coordinació entre les diverses tasques i els col·laboradors, i assegurui la bona implementació del pla de treball per assolir els objectius del projecte i la bona administració dels diners re-



buts de la Comissió Europea. Mitjançant el portal de participació de la Comissió Europea, la coordinació del projecte li tramet de manera regular, a través d'informes de treball, els resultats que es van obtenint i el progrés en la implementació del projecte.

En el projecte «Smart-4-Fabry» s'ha dissenyat una comunitat virtual de col·laboració basada en l'eina Ulearn i UPCnet, que permet l'establiment i el registre de xats entre els membres de l'equip, la gestió de tota la documentació i el registre dels intercanvis de materials entre els participants. Aquests tipus d'eines són clau per a la gestió del desenvolupament de nanomedicines que vulguin arribar a fases reguladores, ja que permeten l'emmagatzematge i la traçabilitat de totes les dades generades.

### WP10. Requeriments ètics

L'objectiu d'aquest paquet de treball és garantir que tots els grups participants en el projecte «Smart-4-Fabry» apliquin de manera rigorosa els estàndards ètics i les directrius d'Horizon 2020, independentment del país on es realitzi la investigació.

## Conclusions

Tal com s'ha exposat, el projecte «Smart-4-Fabry» té l'objectiu d'avançar el grau de desenvolupament d'una nova formulació basada en l'ús de nanoliposomes amb vista a millorar l'eficàcia de l'enzim GLA en teràpies de reemplaçament enzimàtic per tractar la malaltia de Fabry, gairebé fins a les portes de les fases clíniques. Durant els primers dos anys del projecte, s'ha aconseguit optimitzar la nanoformulació de GLA, de manera que compleix els criteris de qualitat establerts i conté l'enzim en unes concentracions adequades per seguir amb els assaigs *in vivo*. A més, l'EMA ens ha donat el seu *scientific advice* per dissenyar els assaigs preclínic *in vivo*, de manera que permetin prendre fàcilment la decisió d'avançar o no a les fases clíniques. Fins al final del 2020, es realitzaran estudis per comparar la farmacocinètica i l'eficàcia de l'enzim encapsulat en nanoliposomes amb les de l'enzim sense encapsular; també es compararà la nano-GLA amb l'activitat d'un enzim GLA avui aprovat com a medicament. Durant aquest temps també es realitzaran totes les proves toxicològiques per garantir la seguretat de la nano-GLA en un marc regulador.

Finalment, però no per això menys important, es completarà l'escalat del procés d'obtenció de la nano-GLA a una escala quaranta vegades més gran que la de laboratori, i en condicions pre-GMP.

La metodologia de treball establerta en el projecte «Smart-4-Fabry», a més a més de permetre el desenvolupament farmacèutic dels liposomes nano-GLA fins a la preclínica reguladora, pot ser un model per al desenvolupament d'altres nanomedicines basades en l'encapsulació de proteïnes terapèutiques en nanoliposomes.

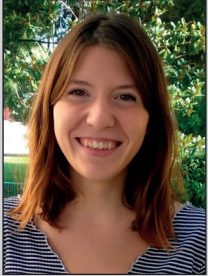
## Agraïments

Agraïm a la Comissió Europea el seu suport, a través del programa H2020, pel finançament del projecte «Smart-4-Fabry» (ID 720942). Al Ministeri d'Economia i Empresa, el suport econòmic al projecte MOTHER (MAT2016-80826-R). Judit Tomssen agraeix a l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya el suport financer concedit amb la beca predoctoral FI-AGAUR (2018).

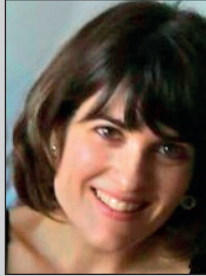
## Referències

- [1] BALLABIO, A.; GIESELMANN, V. «Lysosomal disorders: from storage to cellular damage». *Biochim. Biophys. Acta*, 1793 (2009), p. 684-696.
- [2] BROOKS, D. A. «Immune response to enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorder patients and animal models». *Mol. Genet. Metab*, 68 (1999), p. 268.
- [3] PISANI, A.; VISCIANO, B.; ROUX, G. D.; SABBATINI, M.; PORTO, C.; PARENTI, G.; IMBRIACO, M. «Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of the literature». *Mol. Genet. Metab*, 107 (2012), p. 267-275.
- [4] FERVENZA, F. C.; TORRA, R.; WARNOCK, D. G. «Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in the nephropathy of Fabry disease». *Biologics*, 2 (2008), p. 823-843.
- [5] DESNIK, R. J. «Enzyme replacement therapy for Fabry disease: lessons from two  $\alpha$ -galactosidase A orphan products and one FDA approval». *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4 (2004), p. 1167-1176.
- [6] SOLOMON, M.; MURO, S. «Lysosomal enzyme replacement therapies: historical development, clinical outcomes, and future perspectives». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 118 (2017), p. 109-134.

- [7] SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. «Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers». *Soft Matter*, 6 (2010), p. 4026.
- [8] BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. «Liposomes as nanomedical devices». *Int. J. Nanomed.*, 10 (2015), p. 975-999.
- [9] CABRERA, I. «Multifunctional nanovesicle-bioactive conjugates prepared by a one-step scalable method using CO<sub>2</sub>-expanded solvents». *Nano Lett.*, 13 (2013), p. 3766-3774.
- [10] VENTOSA, N.; VECIANA, J.; SALA, S.; CANO, M. «Method for obtaining micro- and nano-disperse systems». Data de prioritat: 31/05/2005, número de patent concedit EP1843836; US7754777; CA2566760 (propietat de Nanomol Technologies S.L.).
- [11] CABRERA, I.; ABASOLO, I.; CORCHERO, J. L.; ELIZONDO, E.; GIL, P. R.; MORENO, E.; FARAUDO, J.; SALAS, S.; BUENO, D.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; RIVAS, M.; MELGAREJO, M.; PULIDO, D.; ALBERICIO, F.; ROYO, M.; VILLAVÉRDE, A.; GARCÍA-PARAJÓ, M. F.; SCHWARTZ, S. Jr.; VENTOSA, N.; VECIANA, J. « $\alpha$ -galactosidase-A loaded-nanoliposomes with enhanced enzymatic activity and intracellular penetration». *Adv. Healthcare Mater.*, 5 (2016), p. 829-840.
- [12] Centro de Investigación Biomédica en Red - Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina. < <https://www.ciber-bbn.es> > [Consulta: 27 agost 2019].
- [13] «Development of nanomedicines for enzymatic replacement therapy in Fabry disease». Projecte finançat per la Marató de TV3 i coordinat per S. Schwartz (CIBBIM - Hospital Universitari Vall d'Hebron), 2011-2013.
- [14] VENTOSA, N.; VECIANA, J.; CABRERA, I.; ELIZONDO, E.; SALA, S.; MELGAREJO, M.; ROYO, M.; ALBERICIO, F.; PULIDO, D.; ABASOLO, I.; SCHWARTZ, S.; VILLAVÉRDE, A.; CORCHERO, J. L. «Functionalized liposomes useful for the release of bioactive compounds». Data de prioritat: 29/06/2012, número de patent concedit WO2014/001509 (llicenciada a Biopraxis Research).



J. Tomsen-Melero



E. González-Mira



N. Segovia



J. Veciana



N. Ventosa

**Judit Tomsen-Melero** és graduada en nanociència i nanotecnologia per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, 2016) i màster en biomedicina (Universitat de Barcelona, 2017). Actualment està realitzant la tesi doctoral al grup Nanomol de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), sota la supervisió de la doctora Ventosa. La seva recerca es basa principalment en l'estudi de nous sistemes liposòmics per al subministrament d'enzims biològics a través de membranes biològiques.

**Elisabet González-Mira** és investigadora del CIBER-BBN en el grup de recerca Nanomol de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC). Té una formació extensa en el camp de les ciències farmacèutiques: doctorat en farmàcia per la Universitat de Barcelona (2011), màster oficial en recerca, desenvolupament i control de medicaments (2007) i màster experimental en ciències farmacèutiques (2004). Actualment participa d'una manera activa en el desenvolupament de noves teràpies farmacològiques basades en el disseny intel·ligent de nous sistemes nanoestructurats que integren principalment biomolècules, utilitzant fluids comprimits per a la seva preparació, a fi de portar-los a assaigs clínics de fase I/II.

**Nathaly Segovia** és doctora en bioenginyeria per la Universitat Ramon Llull (2014). És llicenciada en química per la Universitat de Barcelona (UB) (2009) i màster en biotecnologia molecular (UB, 2010). Actualment és investigadora postdoctoral a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC). Els seus interessos científics integren la química, la ciència de materials i la biologia, per a la seva aplicació en el camp de la nanomedicina.

**Jaume Veciana** és professor d'investigació de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC), director de Nanomol, líder d'un grup del CIBER-BBN i director científic de la infraestructura científica i tècnica singular Nanbiosis. Els seus interessos científics tracten sobre nanociència molecular i nanomedicina. És coautor de més de cinc-cents articles científics i és inventor de setze patents. Ha rebut el Premi Solvay i el de la Real Sociedad Española de Química per les seves contribucions a la química, i el Premi DuPont per les seves contribucions a la nanociència molecular.

**Nora Ventosa** és investigadora científica de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC) i investigadora adscrita al centre d'investigació biomèdica en xarxa CIBER-BBN. La seva recerca està centrada en la química supramolecular i en el desenvolupament de processos sostenibles per a l'obtenció de nous materials amb aplicacions biomèdiques. És codirectora del grup Nanomol pertanyent a la xarxa TECNIO, que comprèn els principals centres i agents implicats en la transferència tecnològica a Catalunya. És sòcia cofundadora de l'empresa derivada Nanomol Technologies. Des del 2016 és membre del Consell d'Administració d'ACCIÓ, agència del Govern català per a la promoció de la competitivitat de l'empresa. És vicepresidenta de la Societat Catalana de Química i membre numerària de l'Institut d'Estudis Catalans. És la coordinadora del projecte europeu «Smart-4-Fabry».