

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 598**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/EP2015/077446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15800777 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3229776**

54 Título: **Composición farmacéutica que combina al menos dos nanopartículas distintas y un compuesto farmacéutico, preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**25.11.2014 EP 14306874**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2023**

73 Titular/es:

**CURADIGM SAS (100.0%)  
60 rue de Wattignies  
75012 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GERMAIN, MATTHIEU;  
MEYRE, MARIE-EDITH;  
POTTIER, AGNÈS y  
LEVY, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones:

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

ES 2 951 598 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que combina al menos dos nanopartículas distintas y un compuesto farmacéutico, preparación y usos de los mismos

### Campo de la invención

- 5 La descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y (ii) al menos un compuesto de interés, generalmente al menos un compuesto farmacéutico, para administrarla a un sujeto que necesita dicho al menos un compuesto de interés, en el que las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas potencian la eficacia del(de los) compuesto(s) de interés. La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.
- 10 Las al menos dos nanopartículas biocompatibles pueden administrarse de forma secuencial o simultánea al sujeto, pero deben administrarse por separado, generalmente con un intervalo de entre más de aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 72 horas, del al menos un compuesto de interés, preferiblemente antes de la administración del al menos un compuesto de interés, a dicho sujeto.
- 15 La dimensión más grande de las al menos dos nanopartículas biocompatibles es generalmente de entre alrededor de 4 nm y alrededor de 500 nm. Como se describe en la presente memoria, el valor de carga superficial absoluta de una primera nanopartícula biocompatible es de al menos 10 mV (|10 mV|) y el valor de carga superficial absoluta de la segunda nanopartícula biocompatible, o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tiene una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial absoluta de la primera nanopartícula biocompatible.
- 20 La administración combinada, generalmente secuencial, al sujeto de al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas junto con al menos un compuesto de interés mantiene el beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o diagnóstico) de dicho al menos un compuesto de interés para una toxicidad reducida del mismo en dicho sujeto, o aumenta su beneficio farmacéutico para una toxicidad equivalente o reducida, en comparación con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por dicho al menos un compuesto cuando se administra a la(s) dosis farmacéutica(s) habitual(es).
- 25 La composición farmacéutica de la invención normalmente permite una reducción de al menos el 10 % de la dosis farmacéutica del compuesto administrado en comparación con la dosis farmacéutica habitual del al menos un compuesto de interés mientras se mantiene el mismo beneficio farmacéutico para una toxicidad equivalente, preferiblemente una toxicidad reducida, para el sujeto, o mientras se aumenta el beneficio farmacéutico para una toxicidad equivalente o reducida para el sujeto.

### 30 Antecedentes

Con el fin de garantizar la seguridad y la eficacia, se requiere que los compuestos terapéuticos se administren selectivamente a su sitio objetivo a una velocidad óptima en el sujeto que los necesita.

- 35 La farmacocinética (FC) es una rama de la farmacología dedicada a la determinación del destino de las sustancias administradas externamente a un organismo vivo. Esta determinación implica etapas de medición de las concentraciones del compuesto en todos los tejidos principales durante un período de tiempo suficientemente largo, preferiblemente hasta la eliminación del compuesto. La farmacocinética es necesaria para describir eficientemente el comportamiento del compuesto *in vivo*, lo que incluye los mecanismos de absorción y distribución, así como los cambios químicos en el organismo. El perfil FC en la sangre se puede ajustar usando varios programas para obtener parámetros FC clave que describen cuantitativamente cómo el cuerpo maneja el compuesto. Los parámetros importantes incluyen la concentración máxima ( $C_{max}$ ), la semivida ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento, el área bajo la curva (AUC) y el tiempo de residencia medio (MRT), es decir, el tiempo promedio durante el cual un compuesto permanece en un organismo. Cuando se observa una circulación sanguínea prolongada de la formulación del compuesto, generalmente se asocia a un aumento de la  $t_{1/2}$ , un aclaramiento reducido, un AUC aumentado y un MRT aumentado. Los datos FC se utilizan a menudo para decidir la dosis y el régimen de dosificación óptimos para mantener la concentración sanguínea deseable con el fin de mejorar la eficacia terapéutica con efectos secundarios mínimos. Además, como bien sabe la persona experta, la concentración sanguínea de un compuesto se correlaciona tanto con su eficacia como con su toxicidad en la mayoría de los casos, en general para fármacos libres.

- 50 Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos terapéuticos y profilácticos tienen un impacto importante en su destino farmacocinético y metabólico en el cuerpo. Por lo tanto, la selección de propiedades fisicoquímicas apropiadas es clave al diseñar un compuesto de este tipo. Sin embargo, dado que el propio organismo no siempre proporciona el compuesto de forma endógena y normalmente se administra externamente, su perfil de biodistribución tiene que optimizarse para adaptarse, y preferiblemente optimizar, la acción farmacológica deseada del mismo.

Se han explorado varios enfoques para optimizar la administración de un compuesto a su sitio objetivo. Una estrategia es diseñar un compuesto terapéutico con propiedades de ocultación para prolongar su semivida en la sangre y, en

consecuencia, mejorar su acumulación en el sitio objetivo. Un enfoque favorable es la unión covalente de polietilenglicol (PEG) al compuesto terapéutico que ha demostrado aumentar la semivida ( $t_{1/2}$ ) *in vivo* del compuesto circulante, y el nivel del aumento de la semivida *in vivo* varía dependiendo en parte de la naturaleza del compuesto y del recubrimiento. Además, se han desarrollado vehículos para fármacos tales como liposomas, emulsiones o micelas para mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos modificando su perfil de biodistribución en el cuerpo del sujeto.

Sin embargo, la falta de selectividad en la biodistribución de los compuestos terapéuticos sigue siendo motivo de preocupación. Hasta el momento, la mala farmacocinética y la alta toxicidad son causas importantes del fracaso en el desarrollo de compuestos terapéuticos.

Como ejemplo, en el contexto del tratamiento del cáncer, la inhibición intencionada de las funciones esenciales del cuerpo para destruir las células cancerosas da como resultado la toxicidad en las células normales, y los médicos tienen que confiar en las diferencias en la dosis-respuesta y la distribución de los compuestos terapéuticos entre los tumores y los tejidos normales para encontrar una posible ventana terapéutica. Es de destacar que la hepatotoxicidad sigue siendo una de las principales razones para la retirada de fármacos del desarrollo farmacéutico y el uso clínico debido a los mecanismos directos e indirectos de lesión celular inducida por fármacos en el hígado.

Un enfoque propuesto para los compuestos nanoparticulados como vehículos de fármacos [*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 11(1):31-59 1994] es inyectar previamente un vehículo señuelo para disminuir, saturar o incluso inactivar la capacidad fagocítica del sistema reticuloendotelial (SRE). El deterioro o bloqueo también puede estar asociado a niveles plasmáticos reducidos de moléculas opsonicas. La administración intravenosa de ciertos agentes, como ésteres alquílicos de ácidos grasos, sulfato de dextrano, sales de elementos de tierras raras (por ejemplo,  $GdCl_3$ ), vehículos de fármacos, vacíos o que encapsulan clodronato, antes de la administración de partículas de prueba, se ha demostrado que induce una reducción de moderada a drástica en la captación en las células de Kupffer.

Por ejemplo, los autores de "*Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors*" [PNAS 2007], informaron del papel del SRE en el aclaramiento de sus nanopartículas "CREKA-SPIO". Los experimentos iniciales mostraron que las nanopartículas "CREKA-SPIO" inyectadas por vía intravenosa (IV) no se acumulaban de manera eficaz en los xenoinjertos de cáncer de mama MDA-MB-435. Por el contrario, se observó una alta concentración de partículas en los tejidos del SRE. Al eliminar los macrófagos del SRE en el hígado con clodronato liposomal, descubrieron una prolongación de 5 veces de la semivida de su partícula. Sin embargo, el agente clodronato induce la apoptosis de los macrófagos del hígado y el bazo, y esto se considera globalmente perjudicial ya que la eliminación de los macrófagos aumenta los riesgos asociados con la inmunosupresión y la infección. En un segundo experimento, los autores probaron liposomas recubiertos con Ni (II) quelado como una posible partícula señuelo con la hipótesis de que el óxido de hierro y el Ni (II) atraerían opsoninas plasmáticas similares y que, por lo tanto, los liposomas de Ni podrían eliminarlas en la circulación sistémica. De hecho, los liposomas de Ni inyectados por vía intravenosa (IV), administrados 5 minutos o 48 horas antes de la inyección de las nanopartículas de CREKA-SPIO, permiten un aumento de cinco veces en la semivida sanguínea de las nanopartículas. Sin embargo, se observó una alta toxicidad que provocó la muerte de los ratones con tumores. También se probaron liposomas simples en lugar de liposomas de Ni. Sin embargo, aunque reducían la toxicidad en comparación con dichos liposomas de Ni, los liposomas simples eran mucho menos eficaces. De hecho, el aumento de la semivida en sangre fue solo de un factor de aproximadamente 2.

El documento WO2005086639 se refiere a métodos para administrar selectivamente un agente deseado a un sitio objetivo en un sujeto, generalmente en el contexto de la exposición a ultrasonidos o rayos X, o en el contexto de la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), así como en el contexto de la terapia. El objetivo del método descrito es mejorar o mantener la eficacia del agente de interés mientras se reduce la dosis total de agentes administrados concretamente gracias a la administración concomitante de un vehículo señuelo inactivo.

La invención descrita emplea un enfoque basado en la probabilidad. Un agente inactivo no selectivo ("vehículo inactivo") se coadministra (es decir, "de manera sustancialmente simultánea") con un agente de interés selectivo (presente en una "composición activa") que exhibe características físicas similares, para facilitar la evasión del SRE por el agente selectivo de interés, lo que permite una absorción mejorada del agente de interés en el sitio deseado. Este enfoque da como resultado una menor exposición de los pacientes al agente de interés y, como consecuencia, un menor costo por dosis de dicho agente de interés. La composición activa y el vehículo inactivo señuelo se administran con una diferencia de cinco minutos, preferiblemente con una diferencia de 2 minutos, o incluso menos. Este enfoque se basa en la presencia de un gran exceso de vehículos "portadores" o "señuelos" no selectivos y en la probabilidad de que este exceso de vehículos señuelo compita con el agente selectivo de interés por la captación por el sistema reticuloendotelial cuando se suministra en presencia de vehículos que seleccionan como objetivo una ubicación deseada. La semivida de las partículas capturadas por el SRE depende de la dosis, es decir, la semivida circulante de las partículas aumenta a medida que aumenta la dosis. Se cree que el aclaramiento más lento asociado con dosis más altas favorece el mantenimiento de una alta concentración de agentes totales que permite una disminución de la dosis del agente de interés que se debe administrar. En otras palabras, una mayor semivida de los agentes totales debido a una dosis global más alta de los mismos debería ser beneficiosa para los agentes selectivos, según los autores del documento WO2005086639. El requisito que implica este enfoque es que el agente activo y el

inactivo se comporten de manera similar en cuanto a sus características de aclaramiento en el SRE, cualquiera que sea su composición respectiva.

En este enfoque, se requiere la inyección casi concomitante del agente inactivo y del activo para aumentar la cantidad global de agentes presentes en la sangre y, en consecuencia, prolongar su semivida en la sangre. Dicha estrategia, que se basa expresamente en un enfoque basado en la probabilidad, requiere necesariamente la asociación del agente activo con un agente selectivo para lograr su acumulación eficaz en el sitio seleccionado como objetivo al conferir a dicho agente activo una ventaja sobre el inactivo. Además, debido a la inyección casi concomitante, puede ser necesario un diseño específico del vehículo inactivo dependiendo del uso previsto de la composición activa.

El documento WO2005/063305 se refiere a un conjunto que comprende una microvesícula llena de gas (con un tamaño generalmente de al menos 0,5  $\mu\text{m}$ ) y un componente (con un tamaño inferior a aproximadamente 100 nm) asociado a dicha microvesícula. El conjunto resultante se va a utilizar como un componente farmacéuticamente activo en formulaciones activas desde el punto de vista diagnóstico y/o terapéutico. Los dos componentes, es decir, la microvesícula llena de gas y el componente asociado a la microvesícula, se administran simultáneamente normalmente para mejorar la formación de imágenes en el campo de la formación de imágenes de contraste por ultrasonidos, incluidas las imágenes selectivas por ultrasonidos, la administración de fármacos mediada por ultrasonidos y otras técnicas de formación de imágenes. El documento EP 2 000 150 describe partículas compuestas de óxido de titanio que comprenden partículas de óxido de titanio y un polímero hidrófilo no iónico unido a una superficie de las partículas de óxido de titanio a través de un grupo funcional que puede volverse citotóxico por irradiación ultrasónica. El documento WO2012/104277 describe un método para monitorear la liberación desde los liposomas de un producto de interés utilizando nanopartículas superparamagnéticas. El documento WO2012/104275 describe un sistema de administración de nanopartículas que permite la liberación controlada de las nanopartículas, en particular un liposoma termosensible que se rompe a la temperatura de transición de fases ( $T_m$ ) de gel a cristalina líquida. He C *et al.* ("Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles", *Biomaterials*, vol. 31, n.º 13, 1 de mayo de 2010, páginas 3657-3666) se refiere al efecto del tamaño de partícula y la carga superficial sobre la absorción celular y la biodistribución de nanopartículas poliméricas. Jeffrey D. Clogston ("NCL Method PCC-2 - Measuring Zeta Potential of Nanoparticles", *Nanotechnology Characterization Laboratory*, 1 de noviembre de 2009) describe un protocolo de medición del potencial zeta para muestras de nanomateriales en disoluciones acuosas. El documento WO2014/057432 describe nanopartículas lipídicas multicomponente para el transporte no viral de ácidos nucleicos y/o fármacos antitumorales.

Como se desprende del estado de la técnica y a pesar de una necesidad médica desde hace mucho tiempo, la mejora de los compuestos (que incluyen los compuestos terapéuticos, profilácticos y diagnósticos) que no pueden usarse de manera eficaz en pacientes debido a su toxicidad inaceptable o a sus parámetros farmacocinéticos desfavorables sigue siendo una preocupación.

### Descripción detallada

La presente invención permite ahora la optimización de la eficacia de un compuesto de interés (también identificado en la presente memoria simplemente como "el compuesto"), o de una combinación de compuestos de interés, cualquiera que sea su uso previsto en el contexto de la terapia, la profilaxis o el diagnóstico. La composición descrita en la presente memoria, que es una combinación de (i) al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y de (ii) al menos un compuesto de interés, normalmente al menos un compuesto farmacéutico (es decir, un compuesto terapéutico, profiláctico o diagnóstico), optimiza la menos un parámetro farmacocinético del compuesto de interés y, como consecuencia, hace posible ahora el desarrollo de compuestos terapéuticos que no podrían haberse desarrollado de otro modo debido, por ejemplo, a su toxicidad inaceptable. Generalmente, la nanopartícula biocompatible no se usa como compuesto farmacéutico, es decir, como compuesto terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

Una composición típica descrita en la presente memoria (identificada en la presente memoria generalmente como una "composición farmacéutica") es una composición que comprende la combinación de (i) al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y (ii) al menos un compuesto ("el compuesto de interés"), en donde la dimensión más larga o más grande de cada una de las al menos dos nanopartículas biocompatibles es generalmente de entre alrededor de 4 nm y alrededor de 500 nm, el valor de carga superficial absoluta de una primera nanopartícula biocompatible (también identificada en la presente memoria como la "primera" nanopartícula biocompatible) es de al menos 10 mV ( $\geq 10$  mV) y el valor de carga superficial absoluta de una segunda nanopartícula biocompatible (también identificada en la presente memoria como la "segunda" nanopartícula biocompatible), o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tiene una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial absoluta de la primera nanopartícula biocompatible.

Normalmente, la proporción entre las nanopartículas biocompatibles (al menos dos distintas) y los compuestos de interés está entre 0,1/1 y 1000/1 o 0,5/1 y 1000/1, preferentemente entre 0,5/1 y 500/1, incluso más preferentemente entre 0,5/1 y 300/1.

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de", cuando se asocian a un valor como, por ejemplo, el tamaño de una nanopartícula o un intervalo de tiempo, indican que una variación con el valor indicado, que sería reconocido por la persona experta como una pequeña variación, no afecta sustancialmente a las propiedades de la materia a la que está asociado y que dicha materia sigue dentro del espíritu de la invención reivindicada.

Un objeto preferido descrito en la presente memoria es una composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y de (ii) al menos un compuesto farmacéutico, donde la dimensión más larga o más grande de cada una de las al menos dos nanopartículas biocompatibles está entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 500 nm, el valor de carga superficial absoluta de una primera nanopartícula biocompatible es de al menos 10 mV ( $|10 \text{ mV}|$ ) y el valor de carga superficial absoluta de una segunda nanopartícula biocompatible, o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tiene una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial absoluta de la primera nanopartícula biocompatible, y dicha composición es para el uso para administrar las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas en un sujeto que necesita al menos un compuesto farmacéutico por separado de la administración de dicho al menos un compuesto farmacéutico a dicho sujeto, normalmente con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas, y en el que la nanopartícula biocompatible no se usa como tal como compuesto farmacéutico.

La administración combinada al sujeto de las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y del al menos un compuesto de interés, a través de la composición de la invención, normalmente permite (mantiene) el mismo beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o diagnóstico) del al menos un compuesto para una toxicidad reducida del mismo para el sujeto, o aumenta el beneficio farmacéutico del al menos un compuesto para una toxicidad equivalente o reducida del mismo para el sujeto (preferiblemente una toxicidad reducida), en comparación con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por la(s) dosis farmacéutica(s) habitual(es) de dicho al menos un compuesto.

La composición farmacéutica de la invención normalmente permite una reducción de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 15 %, de la dosis administrada del al menos un compuesto farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o diagnóstico) en comparación con la dosis farmacéutica habitual de dicho compuesto (i) mientras se mantiene el mismo beneficio farmacéutico para una toxicidad equivalente, preferiblemente una toxicidad reducida, para el sujeto o (ii) mientras se incrementa el beneficio farmacéutico para una toxicidad equivalente o reducida para el sujeto.

Como la forma de la partícula puede influir en su "biocompatibilidad", en la presente memoria se prefieren las partículas que tienen una forma bastante homogénea. Por razones farmacocinéticas, se prefieren, por lo tanto, las nanopartículas que tienen una forma esencialmente esférica/redonda u ovoide. Esta forma también favorece la interacción de las nanopartículas con las células o su captación. Se prefiere particularmente la forma esférica/redonda. En el espíritu de la invención, el término "nanopartícula" se refiere a un producto, en particular un producto sintético, con un tamaño en el rango de nanómetros, normalmente entre alrededor de 1 nm y alrededor de 500 nm, preferiblemente entre alrededor de 4 nm y alrededor de 500 nm, entre alrededor de 4 y alrededor de 400 nm, alrededor de 30 nm y alrededor de 300 nm, alrededor de 20 nm y alrededor de 300 nm, alrededor de 10 nm y alrededor de 300 nm, por ejemplo entre alrededor de 4 nm y alrededor de 100 nm, por ejemplo entre alrededor de 10 nm, 15 nm o 20 nm y alrededor de 100 nm, o entre alrededor de 100 nm y alrededor de 500 nm, generalmente entre alrededor de 100 nm y alrededor de 300 nm.

Las expresiones "tamaño de la nanopartícula", "tamaño más grande de la nanopartícula" y "tamaño más largo de la nanopartícula" generalmente se refieren en la presente memoria a la "dimensión más larga o más grande de la nanopartícula" o al "diámetro de la nanopartícula" cuando es esférica/redonda o de forma ovoide. Se puede utilizar la microscopía electrónica de transmisión (MET) o Crio-MET para medir el tamaño de la nanopartícula. Además, se puede utilizar la dispersión dinámica de luz (DDL) para medir el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en disolución. Estos dos métodos pueden utilizarse además uno tras otro para comparar el diámetro hidrodinámico de una nanopartícula medido por DDL con el tamaño de dicha nanopartícula medido por MET o Crio-MET, con el fin de confirmar dicho tamaño. Un método preferido es la DDL (norma internacional ref. ISO22412 Análisis de tamaño de partículas - Dispersión dinámica de luz, Organización internacional para la estandarización (ISO) 2008).

Tal como se describe en la presente memoria, la carga superficial electrostática absoluta (también identificada en la presente memoria como "carga" o "carga superficial") de la "primera" nanopartícula biocompatible debe ser al menos, preferiblemente superior a,  $|10 \text{ mV}|$  (valor absoluto) y el valor de la carga superficial de la "segunda" nanopartícula biocompatible, o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tiene que tener una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor absoluto de la carga superficial de la "primera" nanopartícula biocompatible. La carga superficial de una nanopartícula se determina normalmente mediante mediciones del potencial zeta en un medio acuoso para una concentración de nanopartículas de entre 0,2 y 10 g/l, para un pH entre 6 y 8, y normalmente para concentraciones de electrolitos en el medio acuoso de entre 0,001 y 0,2 M, por ejemplo 0,01 M o 0,15 M.

Normalmente, la "primera" nanopartícula biocompatible tiene una carga superficial electrostática de al menos  $|10 \text{ mV}|$ , es decir, por debajo de  $-10 \text{ mV}$  o por encima de  $+10 \text{ mV}$ , por ejemplo, por debajo de  $-12 \text{ mV}$  o  $-15 \text{ mV}$  y  $-20 \text{ mV}$  o por encima de  $+12 \text{ mV}$  o  $+15 \text{ mV}$  y  $+20 \text{ mV}$ , normalmente por debajo de  $-15 \text{ mV}$  o por encima de  $+15 \text{ mV}$ . La "segunda" nanopartícula biocompatible, o cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tiene una diferencia

(positiva o negativa) de al menos 10 mV respecto del valor absoluto de la carga superficial de la primera nanopartícula biocompatible.

Preferentemente, la "primera" nanopartícula biocompatible tiene un valor de carga superficial electrónica absoluta ("valor de carga superficial absoluta") superior a 10 mV, y dicha carga es aún más preferentemente una carga negativa.

- 5 Las propiedades combinadas, el tamaño y la carga superficial de las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas permiten una circulación sanguínea corta de al menos dos nanopartículas distintas. Por lo tanto, mediante la administración secuencial de al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas de la invención y los compuestos de interés, no se logra la cocirculación o una cocirculación limitada de las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y del compuesto de interés. Por lo tanto, las propiedades combinadas de las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas, tamaño y carga superficial, permiten el uso seguro del(de los) compuesto(s) de interés
- 10 mientras permiten (mantienen) el mismo beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o diagnóstico) del al menos un compuesto para una toxicidad reducida del mismo para el sujeto, o, en otras palabras, mientras se incrementa el beneficio farmacéutico del al menos un compuesto para una toxicidad equivalente o reducida del mismo para el sujeto (preferiblemente una toxicidad reducida), en comparación con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por la(s) dosis farmacéutica(s) habitual(es) de dicho al menos un compuesto.
- 15

Las al menos dos nanopartículas biocompatibles utilizables en el contexto de la invención son orgánicas. Como se describe en la presente memoria, se puede usar además una mezcla de nanopartículas orgánicas e inorgánicas como al menos dos partículas biocompatibles.

- 20 Cuando son orgánicas, las nanopartículas presentes en la composición farmacéutica descrita en la presente memoria pueden ser nanopartículas basadas en lípidos (glicerolípidos, fosfolípidos, esteroides lipídicos, etc.), tales como nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas basadas en proteínas también identificadas en la presente memoria como "nanopartículas proteicas" (por ejemplo, albúmina), nanopartículas basadas en polímeros ("nanopartículas poliméricas"), nanopartículas basadas en copolímeros ("nanopartículas copoliméricas"), nanopartículas basadas en carbono, nanopartículas similares a virus (por ejemplo, vectores virales) o una mezcla de las mismas.

- 25 Las nanopartículas orgánicas pueden ser además nanoesferas (nanopartículas simples) o nanocápsulas (nanopartículas huecas) tales como liposomas, geles, hidrogeles, micelas, dendrímeros, etc. También se puede usar una mezcla de las nanopartículas orgánicas descritas en la presente memoria.

El polímero o copolímero puede ser de origen natural o sintético.

- 30 Los ejemplos de polímeros o copolímeros sintéticos (artificiales) y naturales que se pueden utilizar en el contexto de la invención para preparar nanopartículas orgánicas se pueden seleccionar de poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilenglicol (PEG), poliglactina, polilactida, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, polipropilenglicol, polisorbato, poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(metacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de alquilo), polilactato-co-glicolato, poli(amidoamina), poli(etiliminina), alginato, celulosa y polímeros derivados de la celulosa, colágeno, ácido hialurónico, poli(ácido glutámico) (PGA), actina, polisacárido y gelatina.

- 35 Cuando es inorgánico y cuando su dimensión más larga está normalmente por debajo de aproximadamente 10 nm, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 8 nm, por debajo de aproximadamente 7 nm, comprendida normalmente entre aproximadamente 7 nm y aproximadamente 4 nm, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 6 nm, por debajo de aproximadamente 5 nm o por debajo de alrededor de 4 nm, la nanopartícula puede estar hecha de cualquier material inorgánico. El material inorgánico puede comprender, por ejemplo, elementos metálicos del período 3, 4, 5, 6
- 40 de la tabla periódica de Mendeleev, incluidos los lantánidos. Cuando la dimensión más larga de la nanopartícula está generalmente por debajo de los 10 nm, las nanopartículas pueden ensamblarse en estructuras más grandes. El ensamblaje de las nanopartículas en una estructura más grande generalmente puede desencadenarse por las interacciones entre las nanopartículas y polímero(s) biocompatible(s), proteína(s), etc. También se puede obtener una estructura mayor atrapando las nanopartículas en un vehículo, en general un vehículo simple tal como la estructura de gelatina (también identificada en la presente memoria como "nanopartícula de gelatina") o un vehículo hueco tal como un liposoma. Tras la administración *in vivo*, esas estructuras más grandes pueden liberar adicionalmente la(s)
- 45 nanopartícula(s).

- 50 Cuando es inorgánica y cuando la dimensión más larga de dicha nanopartícula es generalmente de al menos 10 nm, generalmente entre 10 y 500 nm, la nanopartícula puede comprender al menos uno de, o puede consistir en, (i) uno o más elementos metálicos divalentes seleccionados por ejemplo de Mg, Ca, Ba y Sr, (ii) uno o más elementos metálicos trivalentes seleccionados por ejemplo de Fe y Al, y (iii) uno o más elementos metálicos tetravalentes que comprenden Si.

- 55 En un aspecto particular, el material inorgánico de la nanopartícula se selecciona de (i) uno o más elementos metálicos divalentes seleccionados por ejemplo de Mg, Ca, Ba y Sr, (ii) uno o más elementos metálicos trivalentes seleccionados por ejemplo de Fe y Al y (iii) uno o más elementos metálicos tetravalentes que comprenden Si.

En otro aspecto particular, el material inorgánico de la nanopartícula se selecciona de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), carbonato de magnesio ( $\text{MgCO}_3$ ), hidróxido de magnesio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ), hidróxido de hierro ( $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ), oxihidróxido de hierro ( $\text{FeOOH}$ ), óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), hidróxido de aluminio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), oxihidróxido de aluminio ( $\text{AlOOH}$ ) y óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ).

- 5 Las nanopartículas utilizadas en las composiciones descritas en la presente memoria deben ser biocompatibles, es decir, compatibles con los tejidos vivos. Cuando así lo requiera su composición, las nanopartículas deben recubrirse con un material biocompatible para que sean utilizables. En una realización particular de la invención, la nanopartícula mencionada en la presente memoria se cubre así con un recubrimiento biocompatible.

El material biocompatible puede ser un agente que permita la interacción con un objetivo biológico.

- 10 Un agente que forma una carga positiva en la superficie de la nanopartícula puede seleccionarse, por ejemplo, de aminopropiltriétoxissilano o polilisina. Un agente que forma una carga negativa en la superficie de la nanopartícula puede seleccionarse, por ejemplo, de un fosfato (por ejemplo, un polifosfato, un metafosfato, un pirofosfato, etc.), un carboxilato (por ejemplo, citrato o ácido dicarboxílico, en particular ácido succínico) o un sulfato.

- 15 En un aspecto particular, siempre que la carga absoluta de la "primera" nanopartícula sea de al menos 10 mV (10 mV) y el valor de carga superficial absoluta de una segunda nanopartícula biocompatible, o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, tenga un diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial absoluta de la primera nanopartícula biocompatible, las al menos dos nanopartículas distintas pueden recubrirse con un material biocompatible seleccionado de un agente que presenta un grupo estérico. Dicho grupo puede seleccionarse, por ejemplo, de polietilenglicol (PEG); poli(óxido de etileno); poli(alcohol vinílico); poli(acrilato); poli(acrilamida) (poli(N-isopropilacrilamida)); policarbamida; un biopolímero; un polisacárido tal como dextrano, xilano y celulosa; colágeno; un compuesto dipolar tal como polisulfobetaina; etc.

El recubrimiento biocompatible puede comprender además un agente marcador, generalmente un agente que permite la visualización de un color utilizando un equipo de formación de imágenes estándar.

- 25 La administración combinada de al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas junto con al menos un compuesto de interés mantiene el beneficio farmacéutico (es decir, el beneficio terapéutico, profiláctico o diagnóstico), generalmente el beneficio terapéutico, del compuesto de interés para una toxicidad reducida, o aumenta el beneficio farmacéutico del compuesto para una toxicidad equivalente o reducida para el sujeto, normalmente cuando dichas al menos dos nanopartículas se administran (simultáneamente o por separado) al sujeto que necesita el al menos un compuesto de interés por separado de dicho al menos un compuesto de interés, preferiblemente con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas en comparación con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por la(s) dosis farmacéutica(s) habitual(es), generalmente terapéutica(s), de dicho al menos un compuesto de interés en ausencia de cualquier partícula.

- 35 En un aspecto particular, la administración combinada de las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y del al menos un compuesto de interés permite una reducción de al menos el 10%, preferiblemente al menos el 15%, de la dosis terapéutica del compuesto administrado, generalmente cuando se administra en el sujeto que necesita el al menos un compuesto de interés por separado de dicho al menos un compuesto de interés, generalmente con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas antes o después, preferiblemente antes, de dicho compuesto de interés, cuando en comparación con la dosis terapéutica habitual de dicho compuesto mientras se mantiene el mismo beneficio terapéutico para una toxicidad equivalente o una toxicidad reducida (preferiblemente una toxicidad reducida) del(de los) compuesto(s) para el sujeto; o mientras se aumenta el beneficio terapéutico para una toxicidad equivalente o reducida del(de los) compuesto(s) para el sujeto.

En un aspecto particular, las nanopartículas se administran con varios compuestos de interés, generalmente dos compuestos de interés.

- 45 Las nanopartículas se eliminan preferentemente del sujeto al que se le han administrado normalmente entre 1 hora y 6 semanas, por ejemplo 4 semanas, entre 1 hora y 1 mes, por ejemplo, entre 1 hora y 3 semanas, o entre 1 hora y 2 semanas, o entre 1 hora y 1 semana, tras la administración a un sujeto que necesita el compuesto de interés.

- 50 El material que constituye una nanopartícula (que incluye su recubrimiento biocompatible cuando está presente) es importante para determinar la biopersistencia de la nanopartícula. La nanopartícula puede considerarse biodegradable (cuando está constituida por ejemplo por un polímero biodegradable como PLGA o PLA), soluble (óxido de hierro, por ejemplo) o no biodegradable y no soluble. Las nanopartículas biodegradables y solubles facilitan el aclaramiento rápido de las nanopartículas del sujeto.

Se pueden usar diferentes moléculas o agentes de acuerdo con la presente enseñanza como el al menos un compuesto de interés, generalmente como el al menos un compuesto farmacéutico de interés, administrado en combinación con al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas como se describió anteriormente en la presente

memoria. Este compuesto puede ser un compuesto terapéutico, profiláctico o diagnóstico como se ha explicado previamente. Puede ser un compuesto orgánico o un compuesto inorgánico.

Los ejemplos de compuestos orgánicos utilizables como compuestos de interés se pueden seleccionar de un compuesto biológico, un anticuerpo, un oligonucleótido, un péptido sintetizado, un agente terapéutico selectivo de molécula pequeña, un virus oncolítico, un compuesto citotóxico y cualquier profármaco correspondiente o derivado del mismo, etc.

En una realización particular, el compuesto de interés utilizado en el contexto de la presente invención es un compuesto orgánico seleccionado preferentemente de un compuesto biológico, un compuesto terapéutico selectivo de molécula pequeña, un virus oncolítico y un compuesto citotóxico. En otra realización particular, el compuesto de interés se selecciona de un anticuerpo, un oligonucleótido y un péptido sintetizado.

Un compuesto biológico es, por ejemplo, un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo y fármaco, preferiblemente un anticuerpo monoclonal ("mAb"), como infliximab, adalimumab, bevacizumab, rituximab, trastuzumab, ranibizumab, cetuximab, panatimumab; una proteína o una proteína recombinante como enbrel (etanercept) o interferón  $\beta$ -1a; un péptido o un péptido recombinante tal como insulina glargina o betaserón; una vacuna como prevnar 13 o gardasil; un biosimilar como epogin; una enzima o una enzima recombinante como replagal o creon; etc.

Un oligonucleótido es, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un aptámero, tal como mipomersen sódico o purpurina, etc.

Un péptido sintetizado o artificial es, por ejemplo, acetato de glatirámico o acetato de leuprolida.

Un virus oncolítico es un virus terapéuticamente útil que infecta y daña selectivamente los tejidos cancerosos sin causar daño a los tejidos normales. El virus oncolítico se selecciona, por ejemplo, de un adenovirus como Onyx-015, un virus coxsackie como Catavak, un virus del herpes simple como talimogene laherparepvec, un virus del sarampión como MV-CEA, un virus de la enfermedad de Newcastle, un parvovirus, un poliovirus, un reovirus, un virus del valle de Séneca, un retrovirus, un virus vaccinia, un virus de la estomatitis vesicular.

Un agente terapéutico selectivo de molécula pequeña generalmente inhibe los dominios enzimáticos de una proteína mutada, sobreexpresada o de otra manera crítica (objetivo potencial en el contexto del tratamiento del cáncer) en las células malignas. Algunos agentes terapéuticos incluyen aquellos que seleccionan como objetivo la división celular (por ejemplo, un inhibidor de aurora-quinasa o un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina), así como otros mecanismos biológicos como el recambio de proteínas y la modificación de la cromatina (por ejemplo, un inhibidor de histona-desacetilasa). Los agentes terapéuticos selectivos de molécula pequeña son, por ejemplo, imatinib, rapamicina, gefitinib, erlotinib, sorafenib, sunitinib, nilotinib, dasatinib, lapatinib, bortezomib, atorvastatina, etc.

Un compuesto citotóxico es, por ejemplo, un agente modificador del ADN, como una antraciclina (por ejemplo, doxorubicina, daunorubicina, etc.), un agente alquilante (por ejemplo, melfalán o temozolomida), así como un fármaco que interfiere de forma muy precisa con mecanismos fisiológicos definidos, como la polimerización de microtúbulos (por ejemplo, taxol) o la síntesis de metabolitos (por ejemplo, metotrexato). Generalmente se usa un compuesto citotóxico activable en el contexto de la terapia fotodinámica (por ejemplo, fotofrina) y debe ser activado por una fuente externa tal como una fuente láser para producir su efecto terapéutico. Otros compuestos citotóxicos típicos se seleccionan generalmente de agentes quimioterápicos tal como se describe en la presente memoria o como los conoce el oncólogo experto.

Un profármaco (por ejemplo, capecitabina o irinotecano) se metaboliza en su forma activa *in vivo* para producir el efecto terapéutico esperado.

Los ejemplos de compuestos inorgánicos utilizables como al menos un compuesto de interés se pueden seleccionar de un complejo de coordinación de metales de transición, un compuesto radiofarmacéutico, una nanopartícula, etc.

Los complejos de coordinación de metales de transición ofrecen ventajas potenciales sobre los fármacos de base orgánica más comunes, incluida una amplia gama de números y geometrías de coordinación, estados redox accesibles, "capacidad de ajuste" de la termodinámica y la cinética de la sustitución de ligandos, así como una amplia diversidad estructural. Las sustancias basadas en metales interactúan con los objetivos moleculares de las células, afectando a las funciones bioquímicas y provocando la destrucción de las células malignas. Los complejos de coordinación de metales de transición son generalmente agentes citotóxicos (por ejemplo, complejos de coordinación de platino: cisplatino, carboplatino, oxaloplatino o complejos de coordinación de rutenio u oro) que actúan sobre las estructuras del ADN.

Los compuestos radiofarmacéuticos emiten radiaciones con fines de diagnóstico o para destruir selectivamente las células malignas. Los radiofármacos típicos pueden contener, por ejemplo, estroncio-89, talio-201, tecnecio-99, samario-83, etc.



La nanopartícula se puede seleccionar generalmente de una nanopartícula de óxido de metal (véase el documento WO 2009/147214 y el documento WO 2007/118884, por ejemplo), una nanopartícula metálica (por ejemplo, nanopartícula de oro, platino o plata), una nanopartícula de sulfuro metálico ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ , por ejemplo), y cualquier mezcla de los mismos (por ejemplo, una nanopartícula de oro cubierta con un material de óxido de hafnio). La nanopartícula es, por ejemplo, una nanopartícula que se puede activar a través de una fuente externa como una fuente de radiación electromagnética, una fuente de ultrasonidos o una fuente magnética, etc.

El al menos un compuesto de interés, que se administra en combinación con una nanopartícula biocompatible como se describió anteriormente (generalmente administrada secuencialmente como se describe en la presente memoria), puede encapsularse en un vehículo o injertarse (o unirse) a dicho vehículo de acuerdo con medios conocidos por la persona experta. Un vehículo típico es, por ejemplo, un liposoma (como DOXIL o ThermoDox que utiliza un lípido termosensible), micela, vehículo polimérico (o "polímero"), hidrogel, gel, vehículo copolimérico, vehículo proteico, vehículo inorgánico.

La composición farmacéutica de la invención (definida por la combinación del compuesto de interés y de las al menos dos nanopartículas distintas) puede usarse en muchos campos, particularmente en la medicina humana o veterinaria. Esta composición es generalmente para el uso en un animal, preferiblemente en un mamífero (por ejemplo, en el contexto de la medicina veterinaria), incluso más preferiblemente en un ser humano cualquiera que sea su edad o sexo.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden usarse en enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema nervioso central (SNC), enfermedades gastrointestinales, trastornos genéticos, trastornos hematológicos, trastornos hormonales, inmunología, enfermedades infecciosas, trastornos metabólicos, trastornos musculoesqueléticos, oncología, enfermedades respiratorias, toxicología, etc. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica se usa en enfermedades cardiovasculares, enfermedades del SNC, oncología, enfermedades infecciosas y trastornos metabólicos.

En el contexto de la presente invención, las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas por un lado y los compuestos ("compuestos de interés") por el otro se administran ventajosamente por separado en un sujeto que necesita dicho(s) compuesto(s), normalmente con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas, normalmente entre más de 5 minutos y aproximadamente 24 horas, preferentemente entre más de 5 minutos o 30 minutos y aproximadamente 12 horas, con el fin de optimizar la eficacia farmacéutica del(de los) compuesto(s).

En la presente descripción, cuando las al menos dos nanopartículas distintas y el(los) compuesto(s) ("compuesto(s) de interés") se van a administrar ventajosamente por separado en un sujeto que necesita dicho(s) compuesto(s) como se explicó anteriormente, en general con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas, y el valor de carga superficial absoluta de la "primera" nanopartícula biocompatible es ventajosamente de al menos 10 mV (10 mV) y la "segunda" nanopartícula biocompatible, o cualquier otra nanopartícula biocompatible adicional, que tiene una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial absoluta de la "primera" nanopartícula biocompatible.

En un aspecto particular de la presente invención, cuando las al menos dos nanopartículas distintas y el(los) compuesto(s) ("compuesto(s) de interés") se administran por separado en un sujeto que necesita dicho compuesto con un intervalo de entre más de 5 minutos y aproximadamente 24 horas, y las nanopartículas se administran preferentemente antes que el(los) compuesto(s), el valor de carga superficial absoluta de la "primera" nanopartícula biocompatible es ventajosamente de al menos 15 mV (15 mV).

También se describe en la presente memoria un método para tratar a un sujeto que padece una enfermedad como las mencionadas en la presente memoria, en el que dicho método comprende administrar a dicho sujeto una composición farmacéutica de la invención, generalmente administrando al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas y al menos un compuesto de interés, como se describe en la presente memoria. Cualquiera de las al menos dos nanopartículas o al menos un compuesto de interés puede administrarse primero al sujeto siempre que las al menos dos nanopartículas biocompatibles por un lado y el al menos un compuesto por el otro se administren entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas entre sí. La administración de cualquiera de dichas al menos dos nanopartículas o al menos un compuesto de interés puede ser una sola administración de cada uno, administraciones repetidas de cada uno, por ejemplo, varias administraciones consecutivas de cada uno. Las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas pueden administrarse una vez y el al menos un compuesto de interés puede administrarse más de una vez y viceversa.

En una realización particular, las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas se administran al menos al inicio de un protocolo que comprende varias administraciones del al menos un compuesto de interés, es decir, al menos en la primera administración de dicho al menos un compuesto de interés y antes o después de la administración del mismo.

En otra realización particular, las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas no se administran al inicio de un protocolo que comprende varias administraciones del al menos un compuesto de interés y no se administran antes

de la segunda o tercera administración de dicho al menos un compuesto de interés, y antes o después de la administración del mismo.

En el contexto de estas dos últimas realizaciones, las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas también pueden administrarse juntas (antes o después, como se explicó anteriormente) con al menos un compuesto de interés durante parte o la totalidad de las administraciones posteriores de dicho al menos un compuesto de interés.

En una realización particular, las al menos dos nanopartículas distintas de la invención se administran al sujeto antes de la administración a dicho sujeto del al menos un compuesto de interés, generalmente entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas antes de la administración de dicho al menos un compuesto de interés.

Las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas de la composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por cualquier vía, como subcutánea, intradérmica, vía oral, vía nasal (inhalación), intravenosa (IV), intraarterial y/o intraperitoneal. Una vía de administración preferida es la vía intravenosa. Las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas de la composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por diferentes vías simultáneamente o por separado.

El(los) compuesto(s) de interés de la composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por diferentes vías tales como subcutánea, intravenosa (IV), intradérmica, intraarterial, vías respiratorias (inhalación), intraperitoneal, intramuscular y/o vía oral (*per os*).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Vista esquemática de posibles rutas para la eliminación de compuestos terapéuticos de la circulación sanguínea en función del tamaño del compuesto (dimensión más larga).

Figura 2: Representación esquemática del programa de tratamientos para la composición farmacéutica que comprende (i) las al menos dos nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 y (ii) el Dox-NP® en xenoinjertos MDA-MB-231-lucD3H2LN.

figura 3: Fórmula química del ácido L-glutámico, N-(3-carboxi-1-oxopropil)-, 1,5-dihexadecil éster (SA-lípido)

### Ejemplos

**Ejemplo 1:** Síntesis de liposomas como "primeras" y/o "segundas" nanopartículas biocompatibles.

Los liposomas se preparan utilizando el método de rehidratación de película lipídica.

Síntesis de "primeras" y/o "segundas" nanopartículas biocompatibles con un valor absoluto de carga superficial de al menos 10 mV (|10 mV|):

a) los lípidos se solubilizaron en cloroformo. El cloroformo se evaporó finalmente bajo un flujo de nitrógeno. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 20 mM y NaCl 140 mM a pH 7,4 se realizó a 60 °C, de modo que la concentración de lípidos fue de 25 mM.

Se usó la siguiente composición de lípidos para preparar liposomas cargados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 62% mol; HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 20% mol; COL (colesterol) 16% mol; POPS (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilserina) 1% mol; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenglicol)-2000]) 1% mol.

b) luego se realizaron 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C.

c) se usó una extrusora Thermobarrel (LIPEXTM Extruder, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. En todos los casos, la extrusión se realizó a 60 °C. En primer lugar, se realizaron 5 pases a través de una membrana de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,45 µm a una presión de 5 bares, luego 12 pases a través de una membrana de PES con un tamaño de poro de 0,22 µm a 10 bares y, finalmente, 12 pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,1 µm a 15 bares.

La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 90°. La suspensión de liposomas se diluyó 100 veces en HEPES 20 mM y NaCl 140 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) era igual a aproximadamente 145 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,1.

Como comprenderá la persona experta, se obtuvo la carga superficial deseada gracias a la composición lipídica seleccionada, y su valor se confirmó mediante la medición del potencial zeta utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments).

- 5 Los liposomas se diluyeron 100 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la suspensión resultante se ajustó a pH 7,4. La carga superficial de los liposomas fue igual a aproximadamente -25 mV a pH 7,4, NaCl 1 mM.

Síntesis de "segundas" y/o "primeras" nanopartículas biocompatibles:

a) los lípidos se solubilizaron en cloroformo. El cloroformo finalmente se evaporó bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realizó a 60 °C, de manera que la concentración de lípidos fue de 50 mM.

- 10 Se utilizó la siguiente composición lipídica: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 57% mol; HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 21% mol; COL (colesterol) 16% mol; POPS (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilserina) 5% mol; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenglicol)-2000]) 1% mol.

b) luego se realizaron 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C.

- 15 c) la disolución de liposomas se ultrasonizó después con una sonda a una potencia de 230 W durante 30 s.

- d) se usó una extrusora Thermobarrel (LIPEXTM Extruder, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realizó a 60 °C. Primero, se aplicaron 10 pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,1 µm a una presión de 10 bares, luego 10 pases a través de una membrana de policarbonato (PC) con un tamaño de poro de 0,08 µm a una presión de 15 bares y finalmente 10 pases a través de una membrana de PC con un tamaño de poro de 0,05 µm a una presión de 20 bares.

e) la disolución de liposomas se concentró luego dos veces por ultrafiltración de membrana en concentradores Vivaspín, con una membrana de polietilensulfona (PES) con un punto de corte de 300 KDa.

- 25 La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) era igual a aproximadamente 70 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,1.

- 30 La carga superficial de los liposomas se determinó mediante la medición del potencial zeta usando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la disolución se ajustó a pH 7. La carga superficial de los liposomas fue igual a aproximadamente -40 mV a pH 7, NaCl 1 mM.

**Ejemplo 2:** Síntesis de liposomas como "primeras" y/o "segundas" nanopartículas biocompatibles.

Los liposomas se preparan utilizando el método de rehidratación de película lipídica.

- 35 - Síntesis de "primeras" y/o "segundas" nanopartículas biocompatibles con un valor absoluto de carga superficial de al menos 10 mV (|10 mV|):

a) los lípidos se solubilizaron en cloroformo. El cloroformo finalmente se evapora bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realiza a 60 °C, de modo que la concentración de lípidos sea de 50 mM.

- 40 Se utiliza la siguiente composición lipídica: HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 59% mol; COL (colesterol) 38% mol; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenglicol)-2000]) 3 % mol.

b) luego se realizaron 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C.

c) la disolución de liposomas se ultrasonizó después con una sonda a una potencia de 230 W durante 30 s.

- 45 d) se usó una extrusora Thermobarrel (LIPEXTM Extruder, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realizó a 60 °C. Primero, se aplicaron 10 pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,1 µm a una presión de 15 bares, luego 18 pases a través de una membrana de policarbonato (PC) con un tamaño de poro de 0,08 µm a una presión de 20 bares.

e) la disolución de liposomas se concentró luego dos veces por ultrafiltración de membrana en concentradores Vivaspín, con una membrana de polietilensulfona (PES) con un punto de corte de 300 KDa.

La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determinó mediante DDL utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) era igual a aproximadamente 90 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,1.

La carga superficial de los liposomas se determinó mediante la medición del potencial zeta usando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la disolución se ajustó a pH 7. La carga superficial de los liposomas fue igual a aproximadamente -25 mV a pH 7, NaCl 1 mM.

La concentración final de lípidos de la disolución de liposomas se midió mediante un ensayo colorimétrico: la fosfolipasa D corta las moléculas de fosfatidilcolina, liberando así el grupo colina que forma un pigmento azul al reaccionar con el sustrato cromogénico. Se halló que la concentración de lípidos fue 100 mM.

- Síntesis de "segundas" y/o "primeras" nanopartículas biocompatibles:

a) los lípidos se solubilizaron en cloroformo. El cloroformo finalmente se evaporó bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realizó a 60 °C, de modo que la concentración de lípidos sea de 50 mM.

Se utilizó la siguiente composición lipídica: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 57% mol; HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 21% mol; COL (colesterol) 16% mol; POPS (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilserina) 5% mol; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenglicol)-2000]) 1 % mol.

b) luego se realizaron 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C.

c) se usó una extrusora Thermobarrel (LIPEXTM Extruder, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realizó a 60 °C. En primer lugar, se realizaron 5 pases a través de una membrana de polietilensulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,45 µm a una presión de 5 bares, luego 12 pases a través de una membrana de PES con un tamaño de poro de 0,22 µm a 10 bares y, finalmente, 12 pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) de 0,1 µm (PVDF) a 15 bares.

d) la disolución de liposomas se concentró luego dos veces por ultrafiltración de membrana en concentradores Vivaspín, con una membrana de polietilensulfona (PES) con un punto de corte de 300 KDa.

La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) era igual a aproximadamente 145 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,1.

La carga superficial de los liposomas se determinó mediante la medición del potencial zeta usando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). La disolución de liposomas se diluyó 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la disolución se ajustó a pH 7. La carga superficial de los liposomas fue igual a aproximadamente -40 mV a pH 7, NaCl 1 mM.

La concentración final de lípidos de la disolución de liposomas se midió mediante un ensayo colorimétrico: la fosfolipasa D corta las moléculas de fosfatidilcolina, liberando así el grupo colina que forma un pigmento azul al reaccionar con el sustrato cromogénico. Se halló que la concentración de lípidos fue 100 mM.

**Ejemplo 3:** Método para la evaluación de la eficacia y toxicidad de una composición farmacéutica que comprende al menos dos suspensiones de nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 y el Dox-NP® en xenoinjertos MDA-MB-231-lucD3H2LN (cf. Figura 2).

La composición farmacéutica que comprende (i) las al menos dos "primeras" y "segundas" nanopartículas biocompatibles distintas del ejemplo 2 y (ii) Dox-NP® (doxorubicina encapsulada liposomal) como el compuesto terapéutico de interés, se administra en ratones atímicos que tienen un tumor xenoinjertado MDA-MB-231-lucD3H2LN de la siguiente manera:

a) el Dox-NP® y las nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 se administran mediante inyección intravenosa (IV) a través de la vena lateral de la cola.

Se inyecta el Dox-NP® (Avanti Polar Lipids; formulación liposomal de 2 mg/ml de doxorubicina HCl a pH 6,5-6,8, en tampón de histidina 10 mM, con sacarosa al 10 % p/v) sin dilución adicional al volumen necesario para obtener 3 mg/kg de doxorubicina inyectada.

Las suspensiones de nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 se utilizan sin dilución adicional.

- 5 b) se tratan cuatro grupos de ratones como se ilustra en la figura 2:

Grupo 1: glucosa estéril al 5% (grupo de control (vehículo)).

A los ratones se les inyecta por vía intravenosa (IV) una disolución estéril de glucosa al 5% los días 1, 7 y 14.

Grupo 2: "Primeras" y "segundas" nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 (grupo de control).

- 10 A los ratones se les inyectan por vía intravenosa (IV) las "primeras" y "segundas" nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 (10 ml/kg) los días 1, 7 y 14. Cada vez (día), la inyección de las primeras nanopartículas biocompatibles se realiza 4 horas antes de la inyección de las segundas nanopartículas biocompatibles.

Grupo 3: Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) (grupo de tratamiento).

A los ratones se les inyecta por vía intravenosa (IV) Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) el día 1, día 7 y día 14.

- 15 Grupo 4: composición farmacéutica, es decir, la combinación de (i) las al menos dos ("primeras" y "segundas") nanopartículas biocompatibles distintas del ejemplo 2 y de (ii) Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) (grupo de tratamiento).

- 20 A los ratones se les inyectan por vía intravenosa (IV) las nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 (10 ml/kg) y el Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) el día 1, el día 7 y el día 14. Cada vez (día), la inyección simultánea de las "primeras" y "segundas" nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 se realiza 4 horas antes de la inyección de Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina).

Grupo 5: composición farmacéutica, es decir, la combinación de (i) las al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas del ejemplo 2 y de (ii) Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) (grupo de tratamiento).

- 25 A los ratones se les inyectan por vía intravenosa (IV) las nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 (10 ml/kg) y el Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina) el día 1, día 7 y día 14. Cada vez (día), la inyección de las "primeras" y "segundas" nanopartículas biocompatibles del ejemplo 2 se realiza 4 horas y 1 hora respectivamente antes de la inyección de Dox-NP® (3 mg/kg de doxorubicina).

c) se evalúa cualquier signo clínico de toxicidad posterior a la administración de la composición farmacéutica; y

d) se mide el volumen tumoral a partir de mediciones bidimensionales del volumen tumoral con un calibre digital usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Longitud (mm)} \times (\text{anchura})^2 \text{ (mm}^2\text{)}}{2}$$

30

Ejemplo 4: Síntesis de liposomas como "primeras" o "segundas" nanopartículas biocompatibles

Los liposomas se preparan utilizando el método de rehidratación de película lipídica:

- 35 a) Los lípidos se solubilizan en cloroformo. El cloroformo finalmente se evapora bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realiza a 60 °C, de modo que la concentración de lípidos sea de 50 mM.

Se usó la siguiente composición de lípidos para preparar liposomas cargados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 58% mol; HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada) 21% mol; COL (colesterol) 16% mol; POPS (1-palmitoil-2-oleoil fosfatidilserina) 5 % mol.

- 40 b) A continuación, se realizan 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C. La ultrasonificación de la disolución de liposomas se realiza durante 30 s cada 3 ciclos de congelación-descongelación y justo antes de la extrusión.

c) Se usa una extrusora Thermobarrel (LIPEX™ Extrusor, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realiza a 60 °C. Se aplican diez pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,1 µm a una presión de 10 bares.

La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determina mediante dispersión dinámica de luz (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluye 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) es igual a aproximadamente 170 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,2.

Como comprenderá la persona experta, la carga superficial deseada se obtiene gracias a la composición lipídica seleccionada, y su valor se confirma mediante la medición del potencial zeta utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). Los liposomas se diluyen 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la disolución se ajusta a pH 7. La carga superficial de los liposomas es igual a aproximadamente -40 mV a pH 7, NaCl 1 mM.

La concentración final de lípidos de la disolución de liposomas se mide mediante un ensayo colorimétrico (método de Bartlett). El método se basa en la determinación de fósforo total a través de una digestión ácida de fosfolípidos. El fosfato inorgánico liberado se hace reaccionar con molibdato de amonio, dando el complejo un color azul intenso. La concentración de lípidos es igual a aproximadamente 50 mM.

Ejemplo 5: Síntesis de liposomas como "primeras" o "segundas" nanopartículas biocompatibles

Los liposomas se preparan utilizando el método de rehidratación de la película lipídica:

a) Los lípidos se solubilizan en cloroformo. El cloroformo finalmente se evapora bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película lipídica con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realiza a 60 °C, de modo que la concentración de lípidos sea de 50 mM.

Se usó la siguiente composición lipídica para preparar los liposomas cargados: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) 45,15% mol; COL (colesterol) 45,15% mol; DSPE-PEG (diestearilfosfatidiletanolamina-[metoxi(polietilenglicol)-2000]) 0,60% mol; ácido L-glutámico, N-(3-carboxi-1-oxopropil)-, 1,5-dihexadecil éster (SA-lípido) 9,10% mol. El SA-lípido proporciona grupos COOH en la superficie de los liposomas.

b) A continuación, se realizan 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C.

c) Se usa una extrusora Thermobarrel (LIPEX™ Extrusor, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realiza a 60 °C. Se aplican siete pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 µm a una presión de 3 bares y diez pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,22 µm a una presión de 10 bares. La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determina mediante dispersión dinámica de luz (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluye 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) es igual a aproximadamente 230 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) igual a aproximadamente 0,2.

Como comprenderá la persona experta, la carga superficial deseada se obtiene gracias a la composición lipídica seleccionada, y su valor se confirma mediante la medición del potencial zeta utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). La disolución de liposomas se diluye 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y el pH de la disolución se ajusta a pH 7. La carga superficial de los liposomas es igual a aproximadamente -60 mV a pH 7, NaCl 1 mM.

La concentración final de lípidos de la disolución de liposomas se mide mediante un ensayo colorimétrico (método de Bartlett). El método se basa en la determinación de fósforo total a través de una digestión ácida de fosfolípidos. El fosfato inorgánico liberado se hace reaccionar con molibdato de amonio y el complejo proporciona un fuerte color azul. La concentración de lípidos es igual a aproximadamente 50 mM.

Ejemplo 6: Síntesis de liposomas como "primeras" o "segundas" nanopartículas biocompatibles

Los liposomas se preparan utilizando el método de rehidratación de película lipídica:

a) Los lípidos se solubilizan en cloroformo. El cloroformo finalmente se evapora bajo un flujo de nitrógeno para formar una película de lípidos en las paredes del tubo de Pyrex. La rehidratación de la película de lípidos con HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4 se realiza a 60 °C y la concentración de lípidos es de 50 mM. Se usó la siguiente composición lipídica para preparar los liposomas de carga: DSPC (1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) 60% mol, COL (colesterol) 35% mol; y succinil PE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-succinilo) 5% mol.

b) A continuación, se realizan 6 ciclos de congelación-descongelación, sumergiendo sucesivamente la muestra en nitrógeno líquido y en un baño de agua regulado a 60 °C. La ultrasonificación de la disolución de liposomas se realiza durante 30 s, cada 3 ciclos de congelación-descongelación y justo antes de la extrusión.

c) Se usa una extrusora Thermobarrel (LIPEX™ Extrusor, Northern Lipids) para calibrar el tamaño de los liposomas a una temperatura y presión controladas. La extrusión se realiza a 60 °C. Se aplican doce pases a través de una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) con un tamaño de poro de 0,22 µm a una presión de 12 bares.

- 5 d) Conjugación de p-aminofenil-α-D-manopiranosido (MAN) con liposomas de succinil PE: La superficie del liposoma de succinil PE se modifica con un ligando derivado de manosa, p-aminofenil-α-D-manopiranosido (MAN), usando el acoplamiento de carbodiimida para desarrollar liposomas conjugados con manosa. MAN está acoplado covalentemente por su grupo amino al grupo de ácido carboxílico de succinil PE, presente en la superficie del liposoma de succinil PE preformado. Brevemente, a la disolución de liposomas de succinil PE preformada se añaden EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida), (relación molar succinil PE/EDC 1:10) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (relación molar NHS/EDC 1:2,5). Luego se ajusta el pH de la suspensión a 6 con NaOH 1 M y se agita la suspensión resultante durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se ajusta el pH de la disolución a 7 con NaOH 1 M y se añade a la disolución la disolución acuosa de MAN (relación molar succinil PE/MAN 1:2). Se reajusta el pH a 7 utilizando NaOH 1 M y se agita la suspensión durante 2 horas más a temperatura ambiente. El exceso de moléculas de MAN, EDC y NHS no unidas se elimina mediante 3 etapas de diálisis con factor de dilución (×500; ×500; ×500) usando una membrana de celulosa de 50 KDa.

Cabe señalar que, debido a la posible dilución durante la diálisis, la disolución de liposomas se puede concentrar mediante centrifugación (normalmente, una centrífuga Sigma 3-15K a 5 °C; 1200 rpm) utilizando ultrafiltración de membrana en concentradores Vivaspín con una membrana de polietilensulfona (PES) y un punto de corte de 300 KDa.

- 20 La distribución de tamaños de los liposomas preparados se determina mediante dispersión dinámica de luz (DDL) utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) con un láser de HeNe de 633 nm en un ángulo de 173°. La disolución de liposomas se diluye 200 veces en HEPES 25 mM y NaCl 150 mM a pH 7,4. El tamaño de los liposomas (es decir, el diámetro hidrodinámico) es de aproximadamente 230 nm (distribución por intensidad) con un índice de polidispersión (IPD) de aproximadamente 0,2.

- 25 Como comprenderá la persona experta, la carga superficial deseada se obtiene gracias a la composición lipídica seleccionada, y su valor se confirma mediante la medición del potencial zeta utilizando un Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments). La disolución de liposomas se diluye 200 veces en una disolución de cloruro de sodio a 1 mM y pH 7. La carga superficial de los liposomas es de alrededor de -70 mV a NaCl 1 mM, pH 7.

- 30 La concentración final de lípidos de la disolución de liposomas se mide mediante un ensayo colorimétrico (método de Bartlett). El método se basa en la determinación de fósforo total a través de una digestión ácida de fosfolípidos. El fosfato inorgánico liberado se hace reaccionar con molibdato de amonio y el complejo proporciona un fuerte color azul. La concentración de lípidos es igual a aproximadamente 50 mM.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos dos nanopartículas poliméricas y/o basadas en lípidos biocompatibles distintas y de (ii) al menos un compuesto farmacéutico, donde la dimensión más larga de cada una de las al menos dos nanopartículas biocompatibles está entre 4 nm y 500 nm, el valor de carga superficial de una primera nanopartícula biocompatible es una carga negativa por debajo de  $-10$  mV, el valor de carga superficial de una segunda nanopartícula biocompatible, o de cualquier nanopartícula biocompatible adicional, es negativo y tiene una diferencia de al menos 10 mV respecto del valor de carga superficial de la primera nanopartícula biocompatible, y donde la composición farmacéutica es para el uso en un método terapéutico, profiláctico o diagnóstico en un sujeto que lo necesita, y el método terapéutico, profiláctico o diagnóstico comprende una etapa de administrar al menos un compuesto farmacéutico al sujeto y una etapa distinta de administrar al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas, y dichas al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas se administran al sujeto por separado del al menos un compuesto farmacéutico, generalmente entre más de 5 minutos y 72 horas antes o después de dicho al menos un compuesto farmacéutico, y donde cada una de las al menos dos nanopartículas biocompatibles no se usa como tal como un compuesto farmacéutico.
2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que al menos dos nanopartículas biocompatibles distintas se van a administrar por separado en una etapa distinta adicional, o simultáneamente, en el sujeto que necesita el compuesto farmacéutico.
3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que se administran al menos dos nanopartículas biocompatibles por separado o simultáneamente en un sujeto que necesita el al menos un compuesto farmacéutico, y entre más de 5 minutos y 72 horas antes que el compuesto farmacéutico.
4. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que cada una de las al menos dos nanopartículas está cubierta además con un recubrimiento biocompatible.
5. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la administración combinada de las al menos dos nanopartículas biocompatibles y del al menos un compuesto farmacéutico mantiene el beneficio terapéutico de dicho al menos un compuesto farmacéutico para una toxicidad reducida, o aumenta el beneficio terapéutico de dicho al menos un compuesto farmacéutico para una toxicidad equivalente o reducida, para el sujeto, en comparación con el beneficio terapéutico y la toxicidad inducida por la(s) dosis terapéutica(s) habitual(es) de dicho al menos un compuesto farmacéutico.
6. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la administración combinada de las al menos dos nanopartículas biocompatibles y del al menos un compuesto farmacéutico permite una reducción de al menos un 10% de la dosis terapéutica del al menos un compuesto farmacéutico administrado en comparación con la dosis terapéutica habitual de dicho al menos un compuesto farmacéutico mientras se mantiene el mismo beneficio terapéutico para una toxicidad equivalente o reducida para el sujeto o mientras se aumenta el beneficio terapéutico para una toxicidad equivalente o reducida para el sujeto.
7. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las al menos dos nanopartículas se eliminan del sujeto al que se le han administrado entre una hora y seis semanas después de su administración a un sujeto que necesita el al menos un compuesto farmacéutico mencionado en la reivindicación 1.
8. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el al menos un compuesto farmacéutico es un compuesto orgánico seleccionado preferiblemente de un compuesto biológico, un compuesto terapéutico selectivo de molécula pequeña, un virus oncolítico y un compuesto citotóxico.
9. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 8, donde el al menos un compuesto farmacéutico se selecciona de un compuesto citotóxico, un compuesto terapéutico selectivo de molécula pequeña y un oligonucleótido.
10. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el al menos un compuesto farmacéutico es un compuesto inorgánico seleccionado de una nanopartícula metálica, una nanopartícula de óxido metálico, una nanopartícula de sulfuro metálico y cualquier mezcla de los mismos.
11. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el al menos un compuesto farmacéutico está encapsulado o unido a un vehículo.



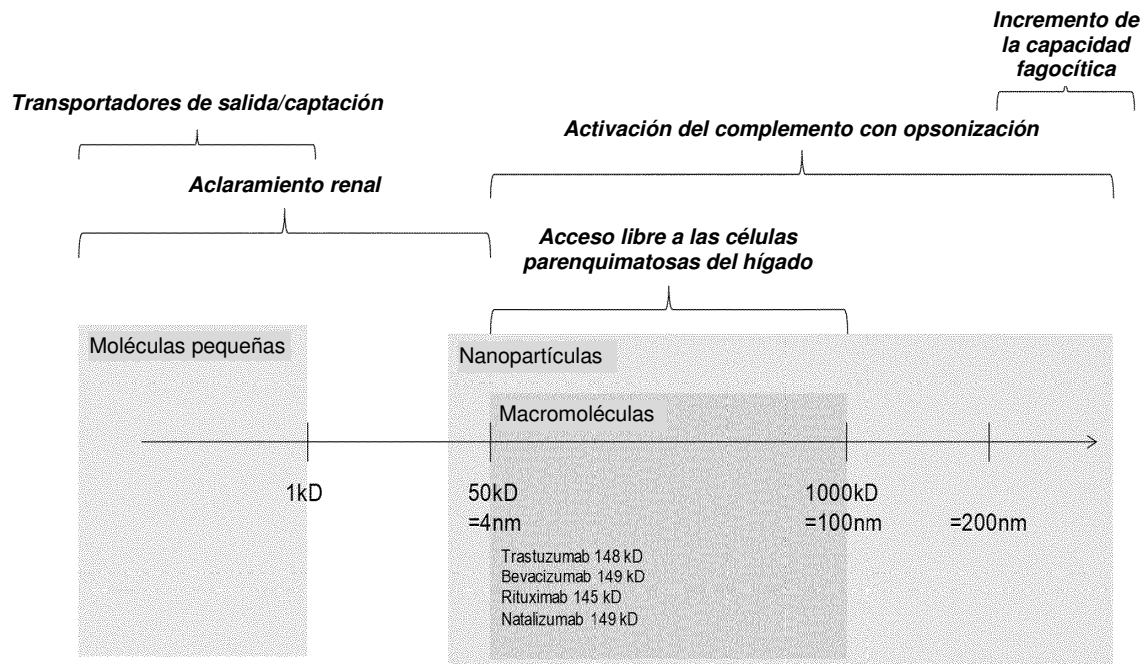
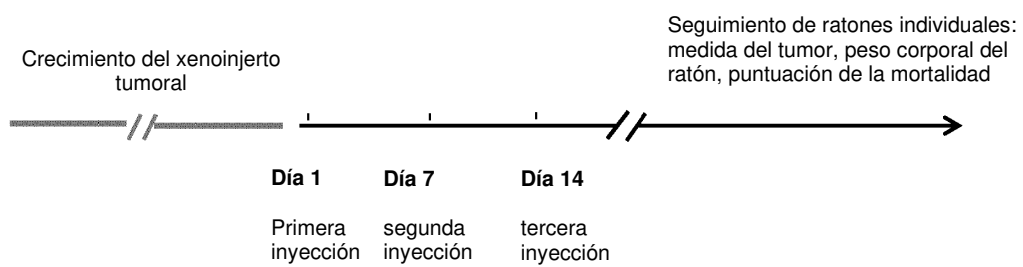


FIGURA 1



**FIGURA 2**

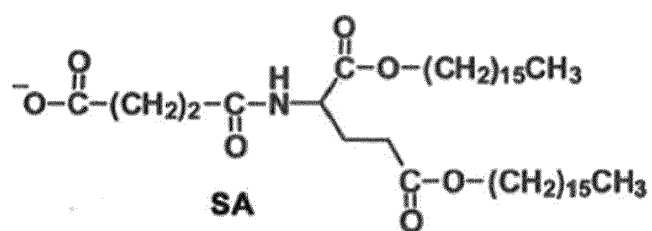


FIGURA 3