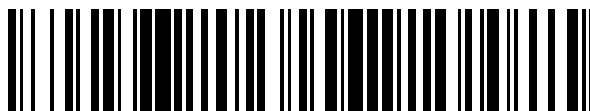


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 498**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2011 PCT/EP2011/067119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12042024**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11776382 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2621539**

54 Título: **Nanopartículas autoensamblables para la liberación de bisfosfonatos en el tratamiento de cánceres humanos**

30 Prioridad:

01.10.2010 IT FI20100206

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

13.08.2018

73 Titular/es:

DE ROSA, GIUSEPPE (20.0%)

Via Giulio Palermo 45

80131 Napoli, IT;

CARAGLIA, MICHELE (20.0%);

ISTITUTI FISIOTERAPICI OSPITALIERI (20.0%);

TASSONE, PIERFRANCESCO (20.0%) y

ABBRUZZESE SACCARDI, ALBERTO (20.0%)

72 Inventor/es:

SALZANO, GIUSEPPINA;

MARRA, MONICA y

LEONETTI, CARLO

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 678 498 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

Nanopartículas autoensamblables para la liberación de bisfosfonatos en el tratamiento de cánceres humanos

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de formulaciones farmacéuticas que contienen bisfosfonatos para el tratamiento y prevención de cánceres humanos.

10 **Estado de la técnica**

[0002] Los bisfosfonatos (BP) son el inhibidor más potente de resorción ósea y representan el tratamiento de elección para diferentes enfermedades, tales como osteoporosis, enfermedad de Paget y metástasis ósea. En oncología, su papel en la enfermedad ósea metastásica está bien establecido, pero existe un interés creciente en su papel potencial en la prevención y el tratamiento de la pérdida ósea inducida por cáncer y sus posibles efectos antitumorales. Se acumula cada vez más evidencia de que los BP son capaces de afectar directamente a células tumorales, además de sus efectos directos sobre osteoclastos. La potencia del efecto antitumoral *in vitro*, generalmente, refleja la potencia de la capacidad antirresortiva con amino-BP (NBP), en particular, siendo el ácido zoledrónico (ZOL) el más potente en ambos aspectos. Los BP inducen apoptosis de células tumorales e inhiben el crecimiento de células tumorales, *in vitro*, de una diversidad de tipos de células tumorales, que incluyen células tumorales de mama (Senaratne et al. 2000, Jagdev et al. 2001a), próstata (Lee et al. 2001), melanoma (Riebeling et al. 2002), osteosarcoma (Mackie et al. 2001, Sonnemann et al. 2001) y mieloma (Shipman et al. 1998).

[0003] Como se sabe, el ZOL pertenece a la clase de NBP que se utilizan para el tratamiento de las complicaciones derivadas de metástasis óseas llamadas eventos relacionados con el esqueleto (dolor, fracturas espontáneas, requisitos de radioterapia ósea, etc.) y para la prevención del tratamiento de cáncer inducido por osteopenia (terapia hormonal en el tratamiento de cáncer de próstata y mama). Sin embargo, hasta la fecha el ZOL todavía no se ha utilizado como un fármaco con actividad anticancerígena directa y su capacidad para actuar directamente contra las metástasis óseas nunca se ha demostrado también para los límites de la detección radiológica y la medición de cáncer en el hueso. Por otra parte, no se informó de una ventaja de supervivencia en los pacientes tratados con NBP si se compara con pacientes no tratados con NBP, con la excepción del estudio de M. Gnant et al. (N Engl J Med. 2009) que demuestra una ventaja de supervivencia en el entorno adyuvante del cáncer de mama dependiente de hormonas tratado con ZOL.

[0004] Por otra parte, nunca se ha informado de efectos directos sobre la masa tumoral inducidos mediante ZOL con la excepción de los informes de casos esporádicos (Kijima et al. Int J Urol. 2008; Okamoto et al. Ann Oncol. 2009; Boudou-Rouquette et al. Ann Oncol. 2009).

[0005] Uno de los límites más importantes de NBP, que hace difícil demostrar la actividad directa anticáncer *in vivo*, es su perfil farmacocinético. De hecho, existe eliminación rápida de ZOL del plasma resultante de la excreción renal y la absorción y acumulación rápida dentro del hueso. Una administración intravenosa de ZOL a la dosis de 4 mg durante 15 minutos da como resultado un aumento brusco en su concentración, con semividas plasmáticas de distribución y eliminación estimadas de 15 min ($t_{1/2}$) y 105 min ($t_{1/2\beta}$) respectivamente. La concentración máxima en plasma ($C_{m\acute{a}x}$) de ZOL es aproximadamente 1 μ M; eso es 10 a 100 veces menos que la requerida en estudios *in vitro* para inducir apoptosis e inhibición de crecimiento en líneas de células tumorales. Por otra parte, aproximadamente el 55 % de la dosis del fármaco administrada inicialmente se retiene en el esqueleto, de donde se libera lentamente a la circulación (Caraglia M. et al. Endocr Relat Cancer. 2006).

[0006] A la luz de estas consideraciones, existe una necesidad de desarrollar nuevas formulaciones de ZOL con una afinidad más baja por los huesos y una semivida más larga en la circulación que daría como resultado una probabilidad aumentada para afectar a tumores periféricos. En el estado de la técnica se sabe que el empleo de nanotecnologías, y en particular liposomas sigilosos (es decir, aquellos que comprenden polímeros hidrófilos, por ejemplo, polietilenglicol o PEG, en sus composiciones), permite la utilización de ZOL en varios tumores (documento US2007/0218116; IT FI2009A000190 a nombre de los mismos solicitantes). En particular, el empleo de ZOL que contiene liposomas permite una reducción considerable del crecimiento tumoral en diferentes modelos animales de cáncer. En el mismo modelo animal los tumores resultaron ser resistentes a ZOL.

[0007] Sin embargo, la estrategia de formulación desarrollada hasta ahora presenta algún inconveniente tal como una estabilidad física de liposomas reducida que requiere que los liposomas se liofilicen, una baja eficacia de encapsulación (aproximadamente un 5 % que corresponde a 100 μ g de ZOL/mg de lípidos) y una determinada pérdida de fármaco después de la rehidratación después de la liofilización.

[0008] El documento WO2008/005509 en el que se utilizan BP como agentes de unión a hidroxiapatita. La invención describe partículas en las que se utiliza BP para unir la superficie biológica, tal como diente o hueso. Por otra parte, la solicitud de patente WO2008/005509 describe nanopartículas PLGA-PEG conjugadas químicamente en el extremo carboxilo de un bisfosfonato que se añadieron en una cantidad traza a una solución de $CaCO_3$ (tamaño

medio 800nm) que dio como resultado una agregación de las partículas de CaCO₃. Dicha composición es adecuada para la liberación de partículas a un diente o hueso. De este modo, esta composición se puede utilizar para modificar la superficie biológica de un diente o hueso, mientras que no es adecuada para evitar la acumulación de BP en el hueso y no se puede utilizar para dirigirse a tumores.

5 [0009] Por lo tanto, es evidente la necesidad de proporcionar formulaciones farmacéuticas que contengan NBP que superen los problemas anteriormente citados y sean eficaces para el tratamiento de tumores.

Sumario de la invención

10 [0010] El objeto de la presente invención son nanocomplejos, también llamados nanopartículas (NP), de acuerdo con la reivindicación 1. Los nanocomplejos mencionados anteriormente también se pueden llamar nanopartículas autoensamblables. Los nanocomplejos mencionados anteriormente son útiles como formulación farmacéutica para el tratamiento o la prevención de crecimiento tumoral y/o metástasis. Los tumores pueden ser tumores sólidos o hematológicos, tales como cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza/cuello, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urogenital masculino y femenino, cáncer de hueso, mieloma múltiple, melanoma, linfoma, tumores primitivos y secundarios.

15 [0011] En particular, la invención se refiere a un bisfosfonato, por ejemplo, el ácido zoledrónico (ZOL), ligado con nanopartículas basadas en sales de calcio y fosfato; dichas partículas se mezclan con otras partículas, por ejemplo, liposomas. Los nanocomplejos, objetos de esta invención, tienen ventajas tales como la posibilidad de prepararse fácilmente de manera inmediata antes del uso, una alta carga de fármaco, una alta reproducibilidad de los resultados. Los nanocomplejos, de acuerdo con esta invención, son entidades nanoparticuladas, para las cuales, sorprendentemente, se adquirieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido de pistola de electrones de campo frío (MEB-PECf) (figura 1). Estos nanocomplejos tienen un diámetro medio que varía de 10 a 500 nm. Por otra parte, dicho sistema ha mostrado un efecto antitumoral más alto que el observado con liposomas que contienen ZOL desarrollados previamente (Marra et al. Biotechnology Advances 2011).

Breve descripción de las figuras

30 [0012]

Figura 1. Muestra imágenes de MEB-PECf, adquiridas con un aumento de 40.000x, de las superficies de algunos nanocomplejos o NP de la realización, de acuerdo con la invención.

35 Figura 2. Ejemplo de luminiscencia asociada a células tumorales inyectadas en un ratón no tratado (panel superior) y en un ratón tratado con nanocomplejos de acuerdo con la invención (NP PLCaPZ; panel inferior) que consigue una regresión completa del tumor después de 56 días desde la inyección inicial de células tumorales.

Descripción detallada de la invención

40 [0013] Sorprendentemente se ha encontrado y, es objeto de la presente invención, que los bisfosfonatos, en formulaciones farmacéuticas basadas en la combinación de nanovectores inorgánicos y lípidos, se pueden utilizar con éxito para el tratamiento de diferentes tumores sólidos y hematológicos, tales como cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza/cuello, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urogenital masculino y femenino, cáncer de hueso, mieloma múltiple, melanoma, linfomas.

45 [0014] En una realización preferida, se pueden añadir ligandos en la superficie de NP a fin de dirigirse a células específicas. Se pueden seleccionar ligandos entre aquellos que tienen especificidad por receptores que se sobreexpresan en células específicas, por ejemplo, células cancerosas, pero que se expresan normalmente o mínimamente en células sanas normales. Estas moléculas deben tener alta afinidad por sus receptores afines, y pueden tener capacidades innatas para inducir endocitosis mediada por receptores. La capa diana se presenta como la capa externa de las NP, donde los ligandos diana se presentan generalmente en la parte superior de la capa sigilosa. Estructuras tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, moléculas pequeñas, aptámeros y péptidos han demostrado todas las capacidades para inducir NP que se dirigen a células cancerosas (M. Wang and M. Thanou, Pharmacological Research 2010; Huynh, et al. Nanomedicine 2010.). Como realización representativa, se prepararon y caracterizaron NP con transferrina humana en su superficie (véase sección experimental).

60 [0015] La formulación se puede administrar al paciente mediante administración parenteral, por ejemplo, mediante intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, inyección intraarterial, que depende del tipo de tumor a tratar. No se pueden excluir otras rutas de administración, tales como oral o transdérmica.

65 [0016] La formulación se puede utilizar para diferentes BP, tales como clodronato, alendronato, etidronato, pamidronato, tiludronato, ibandronato, neridronato, zoledronato, minodronato y risedronato y sus profármacos o derivados biológicos. El BP seleccionado es preferentemente el ácido zoledrónico.

[0017] La cantidad de BP cargados en las nanopartículas está comprendida, preferentemente, entre 0,001 µg y 100 mg de BP/ml de suspensión, más preferiblemente entre 50 µg y 0,250 mg de BP/ml de suspensión.

5 **[0018]** De acuerdo con la invención, los nanovectores son estructuras con un tamaño que varía entre diez y cientos de nanómetros capaces, cuando están asociados a un fármaco, de cambiar su perfil farmacocinético.

[0019] De acuerdo con la invención, los nanovectores son nanopartículas, nanocápsulas o nanoesferas, liposomas u otros nanovectores tales como niosomas, micelas.

10 **[0020]** En la presente invención, se prefieren nanopartículas autoensamblables.

[0021] De acuerdo con la invención, los nanovectores tienen que prepararse, preferentemente, mediante la mezcla de soluciones y/o dispersiones. En particular, la formulación, consiste en nanovectores autoensamblables preparados antes del uso.

15 **[0022]** De acuerdo con la invención, los nanovectores se pueden preparar mediante la mezcla de dos o más soluciones o suspensiones acuosas u orgánicas.

20 **[0023]** De acuerdo con la invención, las nanopartículas lipídicas, pueden ser liposomas u otros nanovectores tales como niosomas y micelas. Estas nanopartículas son, preferentemente, nanopartículas autoensamblables, preferentemente nanopartículas sigilosas (NP que llevan un polímero hidrófilo, es decir, polietilenglicol o PEG, en su superficie).

25 **[0024]** De acuerdo con la invención, las nanopartículas autoensamblables se forman a partir de nanopartículas inorgánicas y nanopartículas lipídicas que llevan un polímero hidrófilo.

30 **[0025]** En particular, de acuerdo con la invención, los nanovectores inorgánicos son nanopartículas basadas en sales inorgánicas. Por ejemplo, y preferentemente, es posible utilizar nanopartículas basadas en sales inorgánicas que contienen Ca, Mg, Sr, Zn y mezclas de los mismos. Preferentemente, estos nanovectores inorgánicos se basan en Ca y P y, en particular, en hidrogenofosfato de calcio nanoprecipitado.

35 **[0026]** Las nanopartículas lipídicas son, preferentemente, liposomas, preferentemente compuestos de fosfoglicéridos y esfingolípidos, junto con sus productos de hidrólisis, esteroides, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, lípidos neutros, lípidos conjugados con polímeros sintéticos o naturales o lípidos unidos a sondas fluorescentes o lípidos unidos a proteínas o péptidos o lípidos conjugados con moléculas capaces de interactuar específicamente con el receptor de la membrana celular. En particular, estos liposomas se basan en una mezcla de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (sal de cloro) (DOTAP), colesterol, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG 2000), preferentemente en una cantidad que varía entre 0-100 %, 0-80 % y 100-0 % (p/p), respectivamente.

40 **[0027]** En una realización preferida, DSPE-PEG 2000 se premezcla con los otros componentes de la mezcla liposomal.

45 **[0028]** Para un aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de los complejos, que comprenden las siguientes fases:

- 50
- a. mezclar una suspensión que contiene nanovectores inorgánicos con una solución que contiene el bisfosfonato, para obtener una suspensión del bisfosfonato ligado con los nanovectores;
 - b. mezclar una suspensión de la nanopartícula lipídica que lleva un polímero hidrófilo con la suspensión obtenida en la fase a.

55 **[0029]** Para preparar NP que llevan un ligando para receptores sobreexpresados mediante células cancerosas, se puede añadir el ligando, incubando las NP obtenidas de acuerdo con el proceso como se describe anteriormente, en una solución que contiene el ligando; o, como alternativa, se puede incluir en la primera incubación de NP las nanopartículas lipídicas que llevan un polímero hidrófilo en una solución que contiene el ligando y, luego, mezclar los conjugados o complejos de nanovectores y ligandos obtenidos con la suspensión obtenida en la fase a.

60 **[0030]** Para un aspecto, la invención se refiere a un kit para preparar las formulaciones farmacéuticas anteriormente mencionadas; dicho kit contiene:

- 65
- al menos un recipiente que contiene un bisfosfonato, en solución o en estado sólido;
 - al menos un recipiente que contiene una suspensión de nanovectores inorgánicos;
 - al menos un recipiente que contiene una suspensión que contiene nanopartículas lipídicas que llevan un polímero hidrófilo.

Preferentemente, el kit, de acuerdo con la invención, puede incluir al menos un recipiente que contiene un ligando o una solución del mismo, para receptores sobreexpresados en células cancerosas. Alternativamente, el ligando puede estar ya presente en el recipiente que contiene una suspensión que contiene nanovectores lipídicos.

5 **[0031]** La presente invención se puede entender mejor a partir de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas autoensamblables sigilosas que contienen ZOL

10 **[0032]** Ingredientes: cloruro de calcio 18 mM, hidrogenofosfato dibásico 10,8 mM, 10 o 50 mg de ácido zoledrónico. Cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000) colesterol (col).

15 Fase 1: Preparación de nanopartículas de fosfato de calcio y sus complejos con ZOL

[0033] Se añadió una solución acuosa de cloruro de calcio (18 mM), gota a gota y bajo agitación magnética, a una solución acuosa sobre hidrogenofosfato dibásico (10,8 mM). Se ajustó de antemano el pH de ambas soluciones a 9,5 con NaOH. Se obtuvieron NP de CaP mediante filtración de la suspensión a través de un filtro de 0,22 µm. Se almacenaron las NP de CaP a 4 °C antes de usar. Se prepararon complejos de NP-CaP/ZOL (NP de CaPZ) mediante la mezcla de una dispersión de NP de CaP con una solución acuosa de ZOL a diferentes concentraciones de ZOL (10 mg/ml de ZOL en agua o 50 mg/ml de ZOL en tampón fosfato a pH 9,5) en una relación de volumen de 50:1.

25 Fase 2: Preparación de liposomas

[0034] Se prepararon liposomas que consistían en DOTAP/col (relación de peso 1:1) o DOTAP/col/DSPE-PEG 2000 (relación de peso 1:1:0,5 o 1:1:1) mediante hidratación de una película lipídica delgada seguida de extrusión. En resumen, se disolvió la mezcla lipídica en 1 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), se añadió la solución resultante a un matraz de fondo redondo de 50 ml y se eliminó el disolvente a presión reducida mediante un evaporador rotatorio en atmósfera de nitrógeno. Después, se hidrató la película lipídica con 1 ml de agua estéril y se mezcló suavemente la suspensión resultante en presencia de perlas de vidrio, después de lo cual el matraz se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, se extruyó la suspensión lipídica utilizando un sistema de extrusión de termobarrel que pasa repetidamente la suspensión bajo nitrógeno a través de membranas de policarbonato con tamaños de poro decreciente (0,4-0,1 µm). Después de la preparación, se almacenaron los liposomas a 4 °C. Cada formulación se preparó por triplicado.

Fase 3: Preparación de nanopartículas autoensamblables que contienen ZOL

40 **[0035]** Se mezclaron NP de CaP ZOL obtenidas de acuerdo con la fase 1 con liposomas catiónicos obtenidos de acuerdo con la fase 2. En resumen, se mezclaron 500 µl de NP de CaPZ con 500 µl de liposomas DOTAP/col, a una concentración final de ZOL de 0,25 o 0,05 mg/ml de suspensión. Luego, se mezcló un mililitro de una suspensión de NP de LCaPZ con 50 µl de dispersión micelar de DSPE-PEG2000 (47 mg/ml) y, luego, se incubó a 50-60 °C durante 10 minutos. Luego, se dejó enfriar la suspensión resultante (NP de post-PLCaPZ) a temperatura ambiente antes de usar.

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas autoensamblables sigilosas que contienen ZOL

50 **[0036]** Ingredientes: cloruro de calcio 18 mM, hidrogenofosfato dibásico 10,8 mM, 10 o 50 mg de ácido zoledrónico. Cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000) colesterol (col).

55 La fase 1 y la fase 2 fueron similares a las descritas en el ejemplo 1.

[0037] Fase 3: Se mezclaron volúmenes iguales de suspensiones que contenían liposomas DOTAP/col/DSPE2000 y NP de CaPZ, respectivamente, en un tubo de vidrio y se dejó reposar la dispersión resultante a temperatura ambiente durante 10 minutos (NP de pre-PLCaPZ).

60 Caracterización de nanopartículas

[0038] Se determinó el diámetro medio de liposomas catiónicos y NP de PLCaPZ, a 20 °C mediante espectroscopia de correlación de fotones (ECF). Se diluyó cada muestra en agua desionizada/filtrada y se analizó con detector a un ángulo de 90 °. Se utilizó como medida de la distribución del tamaño de partícula el índice de polidispersidad (I.P.). Para cada lote, el diámetro medio y la distribución de tamaño fueron la media de tres medidas. Para cada

formulación, se calcularon el diámetro medio y el I.P. como la media de tres lotes diferentes.

[0039] Se midió el potencial zeta (ζ) de la superficie de NP en agua mediante un Zetasizer Nano Z. Se recogieron datos de ζ como promedio de 20 mediciones. Se investigaron análisis morfológicos de NP de LCaPZ, post y pre-PLCaPZ mediante microscopía electrónica de barrido con pistola de emisión de campo frío (MEB-PECF), según lo informado por De Rosa et al. (De Rosa et al. International Journal of Pharmaceutics 2008). Para análisis de MEB-PECF, se fijaron muestras en una mezcla de formaldehído al 4 % y glutaraldehído al 1 % en agua destilada durante 1 hora. Luego, se enjuagaron las muestras en agua destilada mediante ultracentrifugación (80.000 rpm) y se fijaron luego mediante la adición de OsO₄ al 1 % durante 1 hora. Después de un lavado adicional con agua destilada, se filtraron los gránulos en un filtro de policarbonato (0,1 μ m) en un aparato de filtración Swinnex (Millipore, USA). Se colocó un segundo filtro sobre el primero para formar un sándwich en el que se atraparon los gránulos liposomales. Luego, se deshidrataron las muestras en una serie graduada de alcohol (10, 30 y 50 % durante 10 minutos, 70 y 80 % durante 30 minutos, 95 % durante 1 hora y 100 % durante la noche a 4 °C) y se secaron en puntos críticos. Al final del tratamiento, se abrió el Swinnex y se colocaron ambos filtros en un trozo que se limpió con acetona para eliminar cualquier grasa. Se pegaron los discos de carbón de doble adhesivo (EMS, USA) al trozo y se colocaron sobre él los filtros que contenían las muestras. Finalmente, se recubrieron los trozos con una capa nanométrica de oro. Se llevaron a cabo las observaciones mediante un cátodo frío con un microscopio electrónico de barrido de pistola de emisión de campo (PEC Jeol 6700F, Jeol Ltd., Japan). Se tomaron las imágenes de la superficie de las NP a mayores aumentos a 2-5 kV (véase la figura 1).

[0040] Se llevó a cabo el análisis de ZOL mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (CLAR-FI). El sistema de CLAR consistió en una bomba isocrática equipada con una válvula de inyección 7725i, un detector SPV-10A UV-Vis ajustado a la longitud de onda de 220 nm. Se controló el sistema mediante un sistema de control SCL-10A VP conectado con un ordenador. Se adquirieron y analizaron cromatogramas mediante un programa Class VP Client/Server 7.2.1. Se realizó el análisis cuantitativo de ZOL en una columna Gemini de 5 μ m C18 (250 X 4,60 mm, 110 Å Phenomenex, Klwid, USA) equipada con un guardia de seguridad. La fase móvil fue una mezcla 20:80 (v/v) de acetonitrilo y una solución acuosa (hidrogenoortofosfato de dipotasio 8 mM, hidrogenoortofosfato de disodio 2 mM e hidrogenosulfato de tetra-n-butilamonio 7 mM, ajustado a pH de 7,0 con hidróxido de sodio). Se realizó la determinación de ZOL en condiciones isocráticas, a una velocidad de flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente.

[0041] Para las NP de CaPZ, post y pre-PLCaPZ se determinó la cantidad de ZOL no ligado de la siguiente manera: se ultracentrifugó 1 ml de la dispersión de NP (Optima Max E, Beckman Coulter, USA) a 80.000 rpm a 4 °C durante 40 minutos. Se eliminaron cuidadosamente los sobrenadantes y se determinó la concentración de ZOL mediante CLAR-FI. Se han expresado los resultados con eficacia de formación de complejos, calculada como la relación entre la cantidad de ZOL presente en el sobrenadante y la cantidad de carga teórica de ZOL.

Ensayo de cultivo y proliferación celular

[0042] El Prof. G. Arancia del instituto Nacional de Salud de Roma proporcionó células de melanoma humano (M14) y células resistentes a doxorubicina (M14+). Todas las otras líneas celulares se proporcionaron por ATCC y crecieron en un medio sugerido por ATCC en una atmósfera humidificada de aire al 95 %/CO₂ al 5 % a 37 °C. Se realizó la proliferación de líneas celulares de cáncer humano en presencia de concentraciones crecientes de diferentes fármacos mediante ensayo MTT como se describió anteriormente por Caraglia et al. (Oncogene 2004).

Experimento In vivo

[0043] Se adquirieron ratones CD-1 desnudos (nu/nu) de 6-8 semanas de edad de Charles River Laboratories (Milano, Italy).

[0044] Se aclimataron los ratones durante una semana antes de inyectarse con células tumorales. Se inyectaron los ratones intramuscularmente con células tumorales a 3×10^6 células/ratón en 200 μ l de PBS. Seis días después, se observó una masa tumoral de aproximadamente 0,3 cm³ de diámetro, los ratones se distribuyeron al azar en cuatro grupos. Se trataron seis ratones/grupo con ZOL libre o NP que contenían ZOL durante 3 semanas consecutivas. Se calculó la masa tumoral tres veces por semana a partir de las mediciones calibre utilizando la fórmula $\pi/6 AB$, donde A es el diámetro mayor y B es el diámetro menor, que corresponde a la masa tumoral (Sommer K. et al. International Journal of Oncology 2001). Se evaluó la toxicidad mediante la medición del peso corporal dos veces a la semana. Se utilizó la prueba t de Student para la comparación estadística de las diferencias.

[0045] PC3M-luc2 es una línea celular que expresa luciferasa que se transfectó establemente con el gen luc2 de luciferasa de luciérnagas (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Se obtuvieron imágenes de xenoinjertos humanos utilizando la serie 200 del sistema de imágenes IVIS (Caliper Life Sciences). En resumen, se anestesiaron los ratones con una combinación de tiletamina-zolazepan (Telazol, Virbac, Carros, France) y xilazina (xilazina/Rompun BAYER) administrada intramuscularmente a 2 mg/kg. Luego, se inyectaron los ratones intraperitonealmente con 150 mg/kg de D-luciferina (Caliper Life Sciences) y se obtuvieron imágenes en posición supina 10-15 minutos después de la inyección de luciferina. Se obtuvieron y analizaron los datos utilizando la versión 3.0 del software de imagen viva (Caliper Life Sciences).

Evaluación de apoptosis mediante la técnica TUNEL

[0046] Para el ensayo TUNEL, después del lavado en PBS suplementado en BSA al 0,1%, se trataron las células con un kit de detección *in situ*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim Biochemicals). Se visualizaron los núcleos con ADN fragmentado mediante un microscopio de fluorescencia.

Características de las formulaciones objeto de la invención

[0047] Se informa de las características de la formulación que contiene ZOL en la tabla 1. Se obtuvo NP de pre-PLCaPZ con un diámetro medio de aproximadamente 150 nm con IP < 0,2. La carga real de ZOL en NP de pre-PLCaPZ fue de aproximadamente 0,175 mg/ml de dispersión, que corresponde a una eficacia de formación de complejos de aproximadamente 70 %. Por el contrario, se caracterizaron NP de post-PLCaPZ mediante un diámetro medio alto, alrededor de 300 nm y una distribución de tamaño heterogéneo (IP = 0,3). Además, la cantidad de ZOL cargado en NP de post-PLCaPZ fue 5 veces menos que el encontrado en NP de pre-PLCaPZ, ya que un aumento en la concentración de ZOL de 0,05 a 0,25 da como resultado la formación de agregados. También se investigaron las características morfológicas de NP de LCaPZ, NP de pre y post-PLCaPZ mediante análisis MEB-PECf (figura 1). En el caso de NP de LCaPZ, se observaron NP de forma regular con una superficie lisa (figura 1A). Por otro lado, el análisis de la formulación que contiene NP de pre-PLCaPZ mostró partículas de forma irregular con distribución de tamaño homogénea y una superficie bastante áspera (figura 1B). Por el contrario, la formulación que contenía NP de post-PLCaPZ se caracterizó por una dispersión de partículas heterogénea (1C).

Tabla 1. Diámetro, I.P., potencial zeta (ζ) y eficacia de formación de complejos de NP de post y pre-PLCaPZ.

Formulación	Diámetro medio (nm) \pm DE	I.P. \pm DE	ζ (mV) \pm DE	Carga teórica de ZOL (mg/ml)	Eficacia de formación de complejos (% \pm DE)
NP de post-PLCaPZ	309,1 \pm 163,0	0,363 \pm 0,2	10,7 \pm 5,5	0,05	100,0 \pm 0,0
NP de pre-PLCaPZ	147,5 \pm 71	0,152 \pm 0,06	17,5 \pm 5,6	0,250	66,0 \pm 1,0

[0048] Figura 1. Imágenes del análisis de MEB-PECf. (A) NP de LCaPZ; (B) NP de pre-PLCaPZ; (C) NP de post-PLCaPZ. Barra de escala 100 nm.

Actividad antitumoral *in vitro* de ZOL, solo o encapsulado en NP en diferentes líneas de células cancerosas

[0049] Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de ZOL encapsulado en NP de pre y post-PLCaP sobre la inhibición del crecimiento de diferentes líneas celulares de cáncer humano, mediante ensayo MTT. En la tabla 2, se informa de los valores CI50 (50 % de concentración inhibitoria) de ZOL, libre o encapsulado en NP de pre o post-PLCaP, en las diferentes líneas celulares analizadas después de 72 horas. En todos los casos, cuando se considera NP en blanco, la citotoxicidad de NP de post-PLCaP fue significativamente mayor que la observada para NP de pre-PLCaP. Por otra parte, cuando se utiliza NP con ZOL encapsulado, se encontró un factor de potenciación (FP) > 1,0 en todas las líneas celulares probadas, si comparamos con ZOL libre. Las dos formulaciones probadas mostraron diferente eficacia para liberar ZOL a las células y este efecto fue estrictamente dependiente de la línea celular, con la mayor inhibición del crecimiento celular obtenido en células de cáncer de mama. En particular, en MCF7, NP de pre-PLCaPZ causaron una potenciación de aproximadamente 12 veces la citotoxicidad inducida por ZOL, mientras que se encontró un efecto menor (aproximadamente 8 veces) con NP de post-PLCaP.

Tabla 2. Factores de potenciación e inhibición del crecimiento en líneas de células tumorales de diferente desviación histológica.

Líneas celulares	ZOL libre	NP de Post-PLCaPZ	NP de Post-PLCaP en blanco	F.P.	NP de Pre-PLCaPZ	NP de Pre-PLCaP en blanco	F.P.
Próstata							
PC3	12,5	2,2	23	5,7	3,6	57,4	3,5
DU145	25	7,4	42	3,4	11,6	120	2,2
Mama							
MCF7	120	14,7	33,3	8,1	10,1	120	11,8
MDA-MB468	28,4	13	65	2,2	11,3	120	2,5
CG5	74	7,5	30	9,9	16	120	4,6
Cabeza/cuello							

Líneas celulares	ZOL libre	NP de Post-PLCaPZ	NP de Post-PLCaP en blanco	F.P.	NP de Pre-PLCaPZ	NP de Pre-PLCaP en blanco	F.P.
KB	22,8	5,6	19,4	4,07	11,1	120	2
Pulmón							
H1355	65	11	35	5,9	9,5	86	6,8
Páncreas							
Cristal	32	12,7	44,5	1,4	18,5	84,8	1,6
BX-PC3	12,3	11,8	44,6	1,04	9	22	1,4
MIA PaCa	55	16,8	46	3,3	42	120	1,3
Mieloma múltiple							
RPMI	120	15,5	66	7,7	90	120	1,3
DOX	41,9	35	42	1,2	13,8	120	3
KMS	30	2,3	11,8	13	8	44,6	3,8
OPM2	83	35	69,7	2,4	33	95	2,5

Evaluación *in vivo* de actividad antitumoral de formulaciones que contienen ZOL en cáncer de próstata

5 [0050] Se inyectaron células PC-3 en músculos de la pata trasera izquierda de ratones desnudos y seis días después (cuando la masa tumoral era evidente) empezó el tratamiento mediante inyección intravenosa de 20 µg de ZOL libre o ligado con NP de pre-PLCaPZ, una formulación seleccionada por las mejores características tecnológicas. Como control, se trató un grupo de ratones con NP que no contenía ZOL, para evaluar los posibles efectos antitumorales. Se trataron los ratones tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. Se evaluó la eficacia antitumoral de los tratamientos mediante los siguientes puntos finales: a) porcentaje de inhibición del peso tumoral (% IPT), calculado como $[1 - (\text{peso tumoral medio de ratones tratados} / \text{peso tumoral medio de controles})] \times 100$; b) retraso del crecimiento tumoral, evaluado como $T - C$, donde T y C son los tiempos medios para tumores tratados (T) y no tratados (C), respectivamente, para lograr el tamaño equivalente. Los resultados informados en la tabla 3 muestran una inhibición del crecimiento del 17 % en ratones tratados con ZOL libre, lo que sugiere que los tumores PC-3 son resistentes a ZOL. Por el contrario, ZOL ligado con NP de pre-PLCaPZ produce el 44 % de inhibición del crecimiento tumoral. Por lo tanto, la liberación de ZOL de NP es capaz de sensibilizar las células PC-3 a los efectos antitumorales de ZOL. Una comparación entre liposomas sigilosos que contienen ZOL y NP de pre-PLCaPZ puso en relieve la mayor eficacia de la formulación de NP de pre-PLCaPZ. De hecho, esta formulación produjo un aumento de la eficacia antitumoral del 10 % en comparación con los liposomas sigilosos.

20 Tabla 3. Actividad antitumoral de ZOL, solo o encapsulado en las NP autoensamblables.

Tratamiento*	IPT (%) §	T-C (días) &
20 µg de ZOL	17	5
Liposoma sigiloso en blanco	12	3
Liposoma sigiloso que contiene 20 µg de ZOL	35	9
NP en blanco	18	2
ZOL encapsulado en NP	44	11

*Días de tratamiento: 6, 8, 13, 15, 17, 20, 22, 24 después de la inyección de células tumorales. Se inyectaron fármacos de forma intravenosa tres veces a la semana durante tres semanas consecutivas. El tratamiento empezó seis días después de la inyección de células tumorales.
 § Porcentaje de inhibición del peso tumoral calculado en el punto más bajo del efecto.
 & Retraso en el crecimiento tumoral, donde T y C son los tiempos medios para tumores tratados (T) y no tratados (C), respectivamente, para lograr el tamaño equivalente.

Análisis de imagen de bioluminiscencia

25 [0051] Después de 4 meses desde la inyección de células tumorales, no se observó tumor con palpabilidad y en el análisis de luminiscencia con un aparato especializado (figura 2) en animales tratados con NP de PLCaPZ. En este ratón se observó una reducción progresiva de la luminiscencia asociada a las células tumorales con una regresión completa de la luminiscencia a los 56 días desde la inyección de células tumorales. Las NP de PLCaPZ en blanco no

indujeron ningún efecto significativo sobre el peso tumoral si comparamos con grupos libres de ZOL y no tratados (datos no mostrados). Finalmente, es interesante observar que todos los tratamientos fueron bien tolerados por los animales ya que no se ha observado pérdida de peso corporal ni muertes tóxicas.

5 Ejemplo 3

Funcionalización de NP autoensamblables que contienen ZOL que lleva transferrina humana en su superficie

10 [0052] Ingredientes: 18 mM de cloruro de calcio, 10,8 mM de hidrogenofosfato dibásico, 50 mg de ácido zoledrónico. Cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000) colesterol (col), 0,1 mM de transferrina humana (Tf).

Fase 1: Preparación de liposomas catiónicos PEGilados

15 [0053] Se prepararon liposomas que consistían en DOTAP/col/DSPE-PEG 2000 (relación de peso 1:1:0,5) mediante hidratación de una película lipídica delgada seguida de extrusión. En resumen, se disolvió la mezcla lipídica en 1 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), se añadió la solución resultante a un matraz de fondo redondo de 50 ml y se eliminó el disolvente a presión reducida mediante un evaporador rotatorio en atmósfera de nitrógeno. Después, se hidrató la película lipídica con 1 ml de agua estéril y se mezcló suavemente la suspensión resultante en presencia de perlas de vidrio, después de lo cual el matraz se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego, se extruyó la suspensión de liposomas utilizando un sistema de extrusión de termobarrel que pasa repetidamente la suspensión bajo nitrógeno a través de membranas de policarbonato con tamaños de poro decreciente (1,4-0,4 µm). Después de la preparación, se almacenaron los liposomas a 4 °C. Cada formulación se preparó por triplicado.

25 Fase 2: Preparación de nanopartículas de fosfato de calcio y sus complejos con ZOL

30 [0054] Se añadió una solución acuosa de cloruro de calcio (18 mM), gota a gota y bajo agitación magnética, a una solución acuosa sobre hidrogenofosfato dibásico (10,8 mM). Se ajustó de antemano el pH de ambas soluciones a 9,5 con NaOH. Se obtuvieron NP de CaP mediante filtración de la suspensión a través de un filtro de 0,22 µm. Se almacenaron las NP de CaP a 4 °C antes de usar. Se prepararon complejos CaP/ZOL-NP (NP de CaPZ) mediante la mezcla de una dispersión de NP de CaP con una solución acuosa (50 mg/ml de ZOL en tampón fosfato a pH 9,5) a una relación de volumen de 50:1.

Fase 3: Preparación de NP autoensamblables que contienen ZOL

35 [0055] Se mezclaron volúmenes iguales de suspensiones que contenían liposomas DOTAP/col/DSPE-PEG2000, preparados de acuerdo con la fase 1, y NP de CaPZ, preparadas de acuerdo con la fase 2, en un tubo de vidrio y la dispersión resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos (NP de PLCaPZ).

40 Fase 4: Preparación de NP de post-Tf-PLCaPZ

45 [0056] Se prepararon NP de PLCaPZ que llevan Tf en su superficie (NP de post-Tf-PLCaPZ) mediante incubación de la dispersión de NP de PLCaPZ, preparada de acuerdo con la fase 3, con soluciones Tf (10 mg/ml en tampón fosfato a pH 7,4) durante 15 min, a temperatura ambiente, a una relación de volumen de 1:0,5.

Ejemplo 4

Funcionalización de NP autoensamblables que contienen ZOL que lleva transferrina humana en su superficie

50 [0057] Ingredientes: 18 mM de cloruro de calcio, 10,8 mM de hidrogenofosfato dibásico, 50 mg de ácido zoledrónico. Cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2000) colesterol (col), 0,1 mM de Tf.

Fase 1: Preparación de transferrina-liposomas catiónicos PEGilados

55 [0058] Se prepararon Tf-liposomas catiónicos PEGilados mediante preincubación de liposomas catiónicos PEGilados, obtenidos de acuerdo con la fase 1 del ejemplo 3, con transferrina humana (10 mg/ml en tampón fosfato a pH 7,4) a una relación de volumen de 1:1. Se dejaron reposar los liposomas resultantes a temperatura ambiente durante 15 min antes de usar.

Fase 2: Preparación de NP de pre-Tf-PLCaPZ

60 [0059] Se mezclaron Tf-liposomas catiónicos PEGilados, preparados de acuerdo con la fase 1, con NP de CaPZ, preparadas de acuerdo con la fase 2 del ejemplo 3, a una relación de volumen de 1:0,5. Se incubó la dispersión resultante a temperatura ambiente durante 15 min antes de usar.

65

Caracterización de NP

5 **[0060]** Se determinó el diámetro medio de NP de Tf-PLCaPZ a 20 °C mediante espectrometría de correlación de fotones (ECF) (N5, Beckman Coulter, Miami, USA). Se diluyó cada muestra en agua desionizada/filtrada (filtros de polycarbonato de 0,22 µm de tamaño de poro, MF-Millipore, Microglass Heim, Italy) y se analizó con detector a un ángulo de 90 °. Se utilizó como medida de la distribución del tamaño de partícula el índice de polidispersidad (I.P.). Para cada lote, el diámetro medio y la distribución de tamaño fueron la media de tres medidas. Para cada formulación, se calcularon el diámetro medio y el I.P. como la media de tres lotes diferentes. Se midió el potencial zeta (ζ) de la superficie de las NP en agua mediante un Zetasizer Nano Z (Malvern, UK). Se recogieron los datos de ζ como la media de 20 mediciones. Se llevó a cabo el análisis de ZOL mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (CLAR-FI). Para NP de pre y post-Tf-PLCaPZ, se determinó la cantidad de ZOL no ligado de la siguiente manera: se ultracentrifugó 1 ml de la dispersión de NP (Optima Max E, Beckman Coulter, USA) a 80.000 rpm a 4 °C durante 40 minutos. Se eliminaron cuidadosamente los sobrenadantes y se determinó la concentración de ZOL mediante CLAR-FI. Se han expresado los resultados con eficacia de formación de complejos, calculada como la relación entre la cantidad de ZOL presente en el sobrenadante y la cantidad de carga teórica de ZOL.

Características de NP de pre y post-Tf-PLCaPZ

20 **[0061]** Las características de la formulación que contiene transferrina humana se informan en la tabla. NP de pre y post-Tf-PLCaPZ preparadas con los diferentes métodos, tienen un diámetro medio de aproximadamente 150 nm con IP < 0,2. En comparación con NP no conjugadas, se observó que NP conjugadas a Tf (NP de pre y post-Tf-PLCaPZ) mostraban una disminución significativa de la carga neta positiva de las NP, lo que confirma la presencia de Tf en la superficie de las NP.

25

Formulaciones	Diámetro medio (nm) ± DE	I.P. ± DE	ζ ± DE
NP de post-Tf-PLCaPZ	144,4 ± 10,3	0,142 ± 0,07	+9,9 ± 1,5
NP de pre-Tf-PLCaPZ	147,7 ± 15,0	0,169 ± 0,05	+11,3 ± 1,1

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un nanocomplejo, o nanopartícula autoensamblable, que comprende un compuesto bisfosfonato ligado con nanovectores inorgánicos y nanopartículas lipídicas que llevan un polímero hidrófilo; en el que el bisfosfonato se liga primero a nanovectores inorgánicos y las partículas resultantes se ligan luego a una nanopartícula lipídica que lleva un polímero hidrófilo y en el que los nanovectores inorgánicos consisten en nanopartículas de una sal inorgánica de Ca, Mg, Sr o Zn.
- 10 **2.** Un nanocomplejo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nanopartícula lipídica comprende un ligando para receptores sobreexpresados por células cancerosas.
- 3.** Un nanocomplejo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ligando se puede seleccionar entre anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas, péptidos, aptámeros y moléculas pequeñas.
- 15 **4.** Un nanocomplejo de acuerdo con la reivindicación 3 en el que el ligando es transferrina humana.
- 5.** Un nanocomplejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha sal está basada en Ca y P.
- 20 **6.** Un nanocomplejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha nanopartícula lipídica que lleva un polímero hidrófilo es un liposoma.
- 25 **7.** Un nanocomplejo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha nanopartícula lipídica consiste en una mezcla lipídica que comprende fosfoglicéridos y esfingolípidos junto con sus productos de hidrólisis, esteroides, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos, lípidos neutros, lípidos conjugados con polímeros de origen sintético o natural o lípidos unidos a sondas fluorescentes, o lípidos unidos a proteínas o péptidos, o lípidos conjugados con moléculas capaces de interactuar específicamente con receptores presentes sobre la membrana celular; que consisten, preferentemente, en mezclas que comprenden cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), colesterol, 1,2-diacil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG 2000).
- 30 **8.** Un nanocomplejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho bisfosfonato se selecciona a partir de clodronato, alendronato, etidronato, pamidronato, tiludronato, ibandronato, neridronato, zoledronato, minodronato y risedronato.
- 35 **9.** Un nanocomplejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso como una formulación farmacéutica.
- 40 **10.** Un nanocomplejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en el tratamiento de tumores sólidos o hematológicos tales como de próstata, pulmón, cabeza/cuello, colon, hígado, mama, páncreas, riñones, vejiga, tracto urogenital masculino y femenino, huesos, mieloma múltiple, tumores primitivos y secundarios del sistema nervioso central y linfomas.
- 45 **11.** Un proceso para la preparación de nanocomplejos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende las siguientes fases:
- 50 a. mezclar una suspensión que contiene los nanovectores inorgánicos con una solución que contiene el bisfosfonato, para obtener una suspensión que contiene bisfosfonato ligado a nanovectores inorgánicos y, luego,
b. mezclar una suspensión de nanopartícula lipídica que lleva un polímero hidrófilo con la suspensión obtenida en la fase (a).
- 55 **12.** Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11 para preparar nanocomplejos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que las nanopartículas lipídicas comprenden un ligando para receptores sobreexpresados por células cancerosas, comprendiendo dicho proceso:
- después de la fase (b) incubar los nanocomplejos obtenidos con una solución del ligando;
- o, alternativamente, antes de la fase (b), incubar las nanopartículas lipídicas en una solución que contiene el ligando y, luego, realizar la fase (b) mezclando los complejos ligando-nanovectores obtenidos con la suspensión obtenida en la fase (a).
- 60 **13.** Un kit para preparar nanocomplejos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, comprendiendo dicho kit
- 65 ■ al menos un recipiente con una solución de un bisfosfonato o el bisfosfonato en forma sólida;
■ al menos un recipiente con una suspensión de nanovectores inorgánicos;
■ al menos un recipiente que contenga una suspensión que contenga nanopartículas lipídicas que llevan un

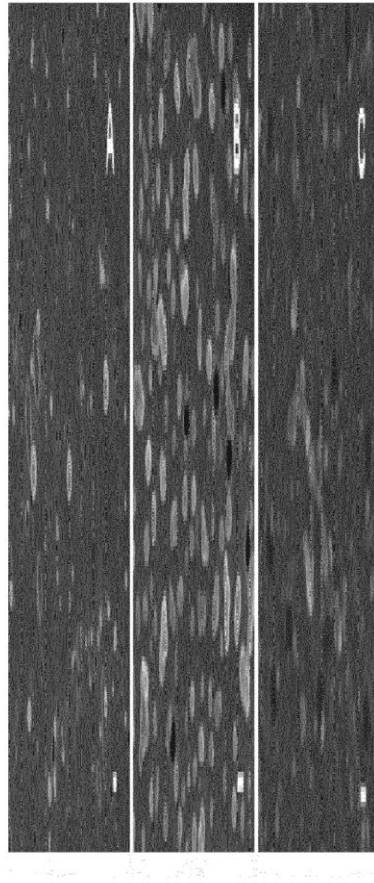
polímero hidrófilo.

14. Un kit de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la suspensión que contiene las nanopartículas lipídicas contiene también el ligando

5 o

el kit comprende, además, al menos un recipiente que contiene el ligando como polvo o en solución acuosa.

FIG. 1



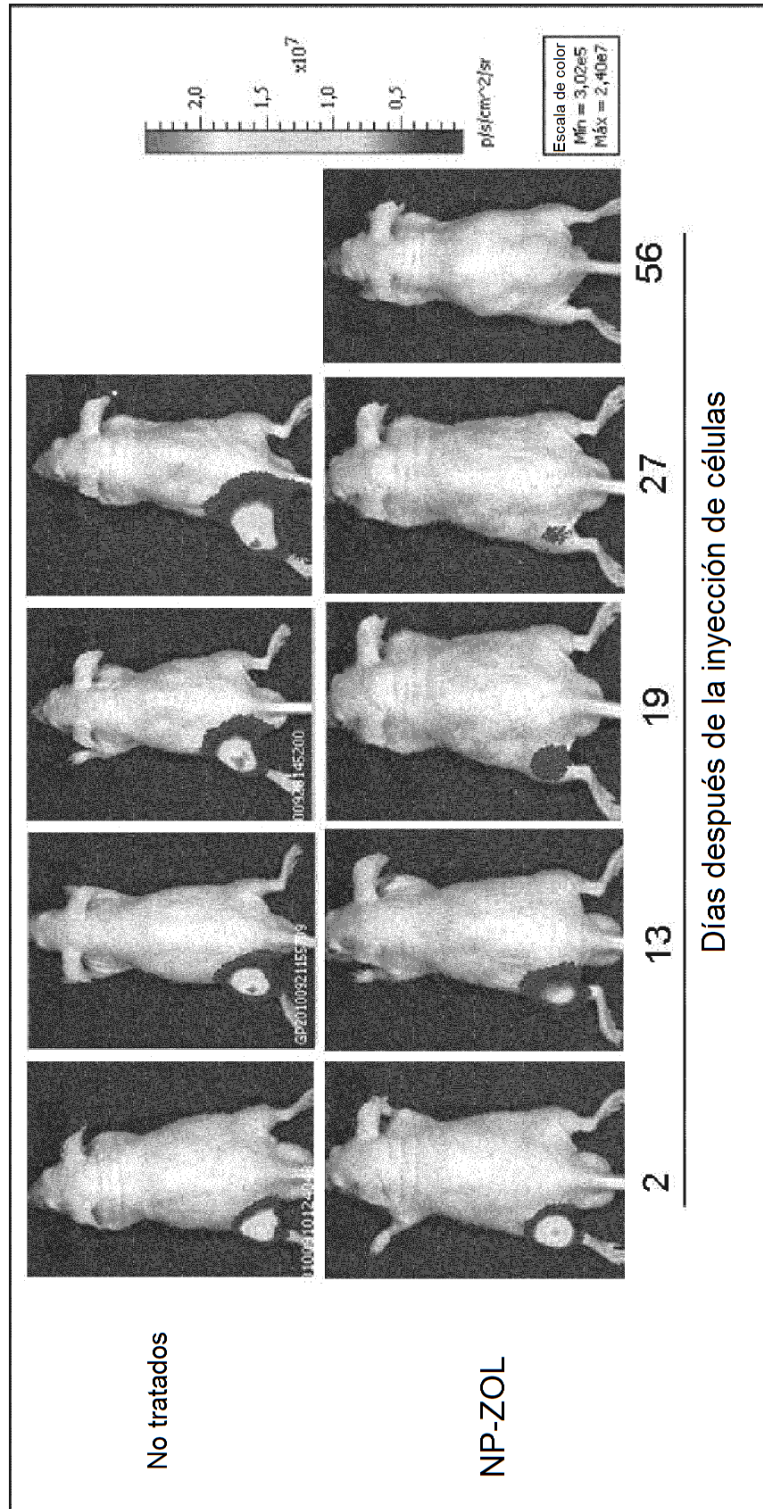


FIG. 2