

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 333**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039411**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052167**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12838792 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2714017**

54 Título: **Nanopartículas encapsuladas en membrana y método de utilización**

30 Prioridad:

02.06.2011 US 201161492626 P

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

08.10.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, LIANGFANG;
FANG, RONNIE, HONGBO;
HU, CHE-MING (JACK) y
COPP, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 685 333 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 encapsuladas en membrana y método de utilización.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de patente nº de serie US 61/492.626, presentada el jueves, 2 de junio de 2011.

10 Declaración relativa a la investigación financiada por el estado federal

La presente invención se llevó a cabo con el apoyo gubernamental bajo la subvención del NSF nº CMMI 1031239, la subvención del NIH nº U54CA119335 y la subvención del DMR nº 1216461. El gobierno posee determinados derechos en la invención.

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para la administración de materiales de nanopartículas sintéticas, incluyendo agentes farmacéuticamente activos, encapsulados con membranas celulares.

20 Antecedentes de la invención

Las nanopartículas poliméricas de circulación prolongada presentan impactos clínicos significativos ya que prometen una administración sistémica sostenida y una mejor administración dirigida mediante mecanismos pasivos y activos (1-3). Se han explorado diferentes enfoques, incluyendo modificaciones sobre el tamaño, superficie, forma y flexibilidad de las partículas a fin de extender el tiempo de residencia de las mismas in vivo (4-6). El estándar de oro actual para el recubrimiento con nanopartículas de escape fagocitario ("stealth") es el polietilenglicol (PEG). La adopción de PEG como fracción de escape fagocitario sobre la superficie de nanopartículas ha conducido a un gran éxito con varios productos clínicos (2, 3) aunque la observación reciente de una respuesta inmunológica anti-PEG ha despertado el interés investigativo sobre su relevancia biológica (7). Se han propuesto materiales zwitteriónicos sintéticos, tales como la poli(carboxibetaina) y la poli(sulfobetaina), como alternativas al PEG debido a su fuerte hidratación que es altamente resistente a la adsorción no específica de proteínas (8, 9). Además, los recientes avances en biología molecular y celular han inspirado a científicos y nanotecnólogos en el modelado de nanotransportadores a partir de la imitación de los glóbulos rojos (GR), los cuales son los vehículos naturales de transporte de circulación prolongada. Las propiedades de los GR, tales como su estructura y las proteínas de superficie se han utilizado como claves del diseño para idear las plataformas de administración de la siguiente generación (10-12). A. Moore et al., Specific targeting and delivery of virus envelope-coated nanoparticle cargoes into receptor-bearing cells and subcellular compartments, NSTI Nanotech 2007, Nanotechnology Conference and Trade Show, Santa Clara, CA, Estados Unidos, 20 a 24 de mayo de 2007, vol. 2, 2007, páginas 370 a 373 describe nanopartículas que consisten en un núcleo interno de poliestireno recubierto con una cubierta vírica.

Aunque se han dedicado esfuerzos significativos a cubrir el hueco entre los nanomateriales sintéticos y las entidades biológicas, la investigación biomédica todavía no ha conseguido un vehículo de administración que imite un GR. Un reto importante radica en la dificultad de funcionalizar nanopartículas con la compleja química superficial de una célula biológica. A pesar de los recientes avances en la reducción de la internalización por macrófagos de las perlas de poliestireno seguido de su conjugación con una proteína membranal inmunosupresora de los GR, CD45 (11), las técnicas de bioconjugación basadas en la química actual con frecuencia conducen a la desnaturalización de las proteínas. Además, estos enfoques de abajo hacia arriba resultan en gran medida inadecuados para duplicar una compleja configuración de proteínas sobre un sustrato a nanoescala.

Por lo tanto, lo que resulta necesario son métodos y composiciones mejorados para la administración de materiales de nanopartículas sintéticas. La presente invención resuelve estas y otras necesidades relacionadas de la técnica.

Sumario de la invención

60 La invención se refiere a una nanopartícula que comprende:

- a) un núcleo interno que comprende un material no celular y
- b) una superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula humana o animal,

65

en la que dicho núcleo interno proporciona soporte a la superficie externa y comprende un material biocompatible o sintético seleccionado de entre el grupo que consiste en poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina y ácido poliglutámico.

La presente invención proporciona nuevas nanopartículas y métodos de utilización y preparación de las mismas.

5 Más específicamente, la nanopartícula inventiva comprende: a) un núcleo interno que comprende un material no celular y b) una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula. El núcleo interno de la nanopartícula inventiva comprende un material biocompatible y/o sintético que incluye poli (ácido láctico-co-glicólico), ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, polilisina o ácido poliglutámico.

10 La superficie externa de la nanopartícula inventiva comprende una membrana celular que comprende una membrana plasmática derivada de un organismo multicelular (p.ej., un animal, un mamífero no humano, un vertebrado o un ser humano). En determinadas formas de realización, la superficie externa de la nanopartícula inventiva comprende una membrana celular natural y comprende además una membrana sintética.

15 En determinadas formas de realización, la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula inventiva se deriva de una célula sanguínea (p.ej., un glóbulo rojo (GR), un glóbulo blanco (GB) o una plaqueta). En otras formas de realización, la membrana celular de la superficie externa se deriva de una célula inmunológica (p.ej., un macrófago, un monocito, una célula B o una célula T), una célula tumoral o de cáncer, y otras células, tales como una célula epitelial, una célula endotelial o una célula neural. En otras formas de
 20 realización, la membrana celular de la superficie externa se deriva de una célula no diferenciada terminalmente, tal como una célula troncal, incluyendo una célula troncal hematopoyética, una célula troncal de médula ósea, una célula troncal mesenquimal, una célula troncal cardíaca y una célula troncal neural. La célula no diferenciada terminalmente puede aislarse en un estado pluripotente a partir de un tejido inducirse para que se torne pluripotente. En todavía otras formas de realización, la membrana celular se deriva de un componente celular u
 25 orgánulo celular que incluye, aunque sin limitación, un exosoma, una vesícula secretoria, un retículo endoplasmático (RE), un aparato de Golgi, una mitocondria, una vacuola o un núcleo.

En determinadas formas de realización, la presente invención proporciona además que la nanopartícula inventiva comprende una carga liberable que puede localizarse en cualquier sitio en el interior o sobre la superficie de la
 30 nanopartícula. Un inductor para liberar la carga liberable a partir de la nanopartícula inventiva incluye, aunque sin limitación, el contacto entre la nanopartícula y una célula, tejido, órgano o sujeto diana, o un cambio en un parámetro ambiental, tal como el pH, la condición iónica, la temperatura, la presión y otros cambios físicos o químicos, circundantes a la nanopartícula. En determinadas formas de realización, la carga liberable comprende uno o más de un agente terapéutico, un agente profiláctico, un agente diagnóstico o marcador, un agente pronóstico, por ejemplo un marcador de imágenes, o una combinación de los mismos. En todavía otras formas
 35 de realización alternativas, la carga liberable es una partícula metálica, una partícula polimérica, un partícula dendrímero o una partícula inorgánica.

La presente nanopartícula puede presentar cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la presente nanopartícula y/o
 40 su núcleo interior pueden presentar la forma de una esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo, cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto y otra forma regular o irregular. La presente nanopartícula puede presentar cualquier tamaño adecuado.

La presente invención proporciona además que en determinadas formas de realización la nanopartícula inventiva
 45 presente un diámetro de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 µm. En determinadas formas de realización, el diámetro de la nanopartícula de la invención es de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm. En otras formas de realización, el diámetro de la nanopartícula puede ser de aproximadamente 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm,
 50 130 nm, 140 nm, 150 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm y 10 µm, o cualquier subintervalo adecuado dentro del intervalo de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 µm, por ejemplo un diámetro de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 150 nm. En determinadas formas de realización, el núcleo interno proporciona soporte a la superficie externa.

La presente invención proporciona además que la nanopartícula de la invención no presenta sustancialmente
 55 constituyentes de la célula a partir de los que se deriva la membrana celular. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede no presentar, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los constituyentes de la célula a partir de la que se deriva la membrana celular.

60 En todavía otras formas de realización determinadas, la nanopartícula de la presente invención mantiene sustancialmente la integridad o actividad estructural natural de la membrana celular, o de los constituyentes de la membrana celular. La integridad estructural de la membrana celular incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la membrana celular o de los constituyentes de la membrana celular, y la actividad de la
 65 membrana celular incluye, aunque sin limitación, la actividad de unión, la actividad de receptor, la actividad de ruta de señalización, y cualesquiera otras actividades que pueda presentar una membrana celular natural normal

o los constituyentes de la membrana celular. En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la presente invención es biocompatible y/o biodegradable. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede mantener, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la integridad estructural o actividad natural de la membrana celular o los constituyentes de la membrana celular.

En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la presente invención comprende la membrana plasmática celular derivada de un glóbulo rojo y un núcleo interno que comprende poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), en la que la nanopartícula no presenta sustancialmente hemoglobina. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede no presentar, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la hemoglobina del glóbulo rojo a partir del cual se deriva la membrana plasmática.

Dicha nanopartícula inventiva presenta una semivida en la circulación sanguínea in vivo por lo menos aproximadamente 2 a 5 veces la semivida de una nanopartícula comparable recubierta con polietilenglicol (PEG). En determinadas formas de realización, dicha nanopartícula inventiva presenta una semivida en la circulación sanguínea in vivo de por lo menos aproximadamente 5 a aproximadamente 40 horas o más prolongada.

En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la invención no presenta sustancialmente inmunogenicidad para una especie o sujeto a partir del que se deriva la membrana celular. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede no presentar, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la inmunogenicidad para una especie o sujeto a partir del que se deriva la membrana celular.

La presente invención proporciona además un sistema de administración de medicamentos y/o una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula inventiva. En determinadas formas de realización, el sistema de administración de medicamento y/o la composición farmacéutica de la presente invención comprende además uno o más ingredientes activos adicionales y/o un portador o excipiente médica o farmacéuticamente aceptable que puede administrarse junto con o en combinación con la nanopartícula de la presente invención.

La presente invención proporciona además un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición en un sujeto que lo necesita, utilizando las nanopartículas inventivas, el sistema de administración de medicamento o la composición farmacéutica que comprende las mismas. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la nanopartícula utilizada para el método inventivo se deriva de una célula de la misma especie del sujeto o se deriva de una célula del sujeto. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la nanopartícula utilizada para el método inventivo se deriva de un glóbulo rojo de la misma especie del sujeto y el glóbulo rojo presenta el mismo tipo sanguíneo del sujeto. En determinadas formas de realización, la nanopartícula, el sistema de administración de medicamento o la composición farmacéutica se administran mediante cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, la nanopartícula, el sistema de administración de medicamento o la composición farmacéutica pueden administrarse por una vía oral, nasal, por inhalación, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, tópica o rectal.

En otras formas de realización, la nanopartícula se administra mediante un sistema de administración de medicamento. En todavía otras formas de realización, el método inventivo comprende además administrar otro ingrediente activo, o un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el sujeto que lo necesita. El método inventivo proporciona además que la nanopartícula de la presente invención pueda administrarse sistémicamente o en un sitio diana del sujeto que lo necesita. Se proporciona además la utilización de una cantidad eficaz de nanopartículas de la presente invención para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o condición en un sujeto que lo necesita.

Además, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas que comprenden un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana celular o plasmática derivada de una célula y un antígeno o un hapteno. Se proporciona además una vacuna que comprende la composición inmunógena de la presente invención. La presente invención proporciona además un método de utilización de la composición inmunógena de la invención para la inducción de una respuesta inmunológica al antígeno o hapteno en un sujeto que necesita dicha inducción, y un método de utilización de la vacuna de la invención que comprende la composición inmunógena para proteger un sujeto frente al antígeno o hapteno. En determinadas formas de realización, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica mediada por células T o células B. Se proporciona además la utilización de una cantidad eficaz de la nanopartícula de la presente invención para la preparación de la composición inmunógena contra un antígeno o hapteno, y la utilización de una cantidad eficaz de la composición inmunógena para la preparación de una vacuna para proteger a un sujeto frente al antígeno o hapteno.

La presente invención proporciona además un método para preparar la nanopartícula de la invención, que comprende mezclar un núcleo interno de nanopartícula que comprende un material no celular con una membrana celular derivada de una célula, ejerciendo simultáneamente energía exógena para formar la

- nanopartícula. En determinadas formas de realización, la energía exógena es una energía mecánica, por ejemplo una energía mecánica ejercida mediante extrusión. En otras formas de realización, la energía exógena es una energía acústica, por ejemplo una energía acústica ejercida mediante sonicación. En todavía otras formas de realización, la energía exógena es una energía térmica, por ejemplo una energía térmica ejercida mediante calentamiento. En todavía otras formas de realización, el método inventivo comprende además mezclar un núcleo interno de nanopartícula que comprende material no celular con una membrana celular natural derivada de una célula con una membrana sintética, ejerciendo simultáneamente energía exógena para formar la nanopartícula que comprende el núcleo interno y una superficie externa que comprende la membrana celular y la membrana sintética.
- La presente invención proporciona además una composición inmunógena específica de neoplasma que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula que comprende un núcleo interno que comprende un material no celular, y una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula de neoplasma, en la que la membrana celular conserva sustancialmente su integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica a la célula de neoplasma. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede mantener, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica a las células de neoplasma.
- En determinadas formas de realización, el núcleo interno proporciona soporte a la superficie externa de dichas nanopartículas. En determinadas formas de realización, el núcleo interno de dichas nanopartículas comprende PLGA y la superficie externa comprende una membrana plasmática derivada de una célula de neoplasma. En otras formas de realización, la superficie externa de dichas nanopartículas comprende una membrana celular natural y comprende además una membrana sintética.
- La nanopartícula contenida en la composición inmunógena específica de neoplasma de la invención no presenta sustancialmente constituyentes de la célula de neoplasma a partir de los que se deriva la membrana celular. Por ejemplo, la presente nanopartícula puede no presentar, en términos de tipos y/o cantidades, por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los constituyentes de la célula de neoplasma a partir de la que se deriva la membrana celular.
- En determinadas formas de realización, la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma de la invención presenta un diámetro de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 μ m. En determinadas realizaciones, dicha nanopartícula presenta un diámetro de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm. En determinadas formas de realización, la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma de la invención comprende además otro ingrediente activo, o una carga liberable. En todavía otras formas de realización, la composición inmunógena específica de neoplasma de la invención comprende además un adyuvante inmunogénico o un inmunopotenciador.
- La presente invención proporciona además una vacuna que comprende la composición inmunógena específica de neoplasma. Se proporcionan además métodos para tratar o prevenir un neoplasma en un sujeto que lo necesita utilizando la composición inmunógena específica de neoplasma de la invención o la vacuna. La presente invención proporciona además la utilización de una cantidad eficaz de la nanopartícula de la presente invención para la preparación de una composición o vacuna inmunógena específica de neoplasma o cáncer para el tratamiento o prevención de un sujeto frente a un neoplasma.
- La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula de la invención para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana celular, en la que la nanopartícula contenida en la composición farmacéutica comprende un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula diana, por ejemplo un glóbulo rojo. En determinadas formas de realización, la toxina insertada en la membrana celular o plasmática de las células diana es parte del mecanismo patogénico natural o la membrana plasmática en la superficie externa de la nanopartícula conserva sustancialmente la toxina. En determinadas formas de realización, la toxina es una toxina bacteriana (p.ej., *S. aureus*), vegetal, fúngica o animal.
- En determinadas formas de realización, el núcleo interno proporciona soporte a la superficie externa y la membrana celular en la superficie externa de la nanopartícula conserva sustancialmente su integridad estructural para conservar sustancialmente la toxina. En todavía otras formas de realización determinadas, la superficie externa de la nanopartícula comprende una membrana celular natural y comprende además una membrana sintética o componentes sintéticos o naturales añadidos a la membrana celular. En todavía otras formas de realización determinadas, la nanopartícula contenida en dicha composición farmacéutica es biocompatible, biodegradable o comprende un material sintético. En todavía otras formas de realización determinadas, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además otro ingrediente activo o un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Se proporcionan además métodos para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana celular utilizando la nanopartícula de la presente invención, así como una composición

farmacéutica que comprende dichas nanopartículas. La presente invención proporciona además la utilización de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende la nanopartícula para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana celular en un sujeto que lo necesita.

Además, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas que comprenden un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula y una toxina de inserción en la membrana celular. Se proporciona además una vacuna que comprende la composición inmunógena de la presente invención. La presente invención proporciona además un método de utilización de la composición inmunógena de la invención para la inducción de una respuesta inmunológica a una toxina de inserción en la membrana celular en un sujeto que necesita dicha inducción, y un método de utilización de la vacuna de la invención que comprende la composición inmunógena para proteger un sujeto frente a la toxina de inserción en la membrana celular. En determinadas formas de realización, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica mediada por células T o células B. Se proporciona además la utilización de una cantidad eficaz de la nanopartícula de la presente invención para la preparación de la composición inmunógena contra una toxina de inserción en la membrana celular y la utilización de una cantidad eficaz de la composición inmunógena para la preparación de una vacuna para proteger a un sujeto frente a una toxina de inserción en la membrana celular.

La presente invención contempla tratamientos, prevención, diagnóstico y/o pronóstico de cualesquiera enfermedades, trastornos o condiciones fisiológicas o patológicas, incluyendo, aunque sin limitación, una enfermedad infecciosa, una enfermedad parasitaria, un neoplasma, una enfermedad de la sangre o de órganos formadores de sangre, un trastorno que implique un mecanismo inmunológico, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, un trastorno mental y del comportamiento, una enfermedad del sistema nervioso, una enfermedad del ojo y anejos, una enfermedad del oído y proceso mastoideo, una enfermedad del sistema circulatorio, una enfermedad del sistema respiratorio, una enfermedad del sistema digestivo, una enfermedad de la piel y tejido subcutáneo, una enfermedad del sistema músculoesquelético y tejido conectivo, una enfermedad del sistema genitourinario, el embarazo, el parto y el puerperio, una condición originada en el periodo perinatal, una malformación congénita, una deformación, una anomalía cromosómica, una lesión, un envenenamiento, una consecuencia de causas externas y una causa externa de morbilidad y mortalidad.

En algunas formas de realización, pueden utilizarse las presentes nanopartículas, sistemas de administración de medicamento, composiciones y métodos farmacéuticos para tratar o prevenir los cánceres y tumores ejemplares indicados en la Tabla 1, para administrar las medicaciones ejemplares para el cáncer indicadas en la Tabla 2 para tratar o prevenir las enfermedades o condiciones oculares ejemplares indicadas en la Tabla 3, para administrar las medicaciones oculares ejemplares indicadas en la Tabla 4, para tratar o prevenir las enfermedades o condiciones ejemplares que afectan a los pulmones indicadas en la Tabla 5, para administrar las medicaciones ejemplares para enfermedades pulmonares/respiratorias indicadas en la Tabla 6, para tratar o prevenir las enfermedades o condiciones ejemplares que afectan al corazón indicadas en la Tabla 7 o para administrar las medicaciones ejemplares para el corazón indicadas en la Tabla 8. En algunas formas de realización, pueden utilizarse las presentes nanopartículas, sistemas de administración de medicamento y composiciones y métodos farmacéuticos para tratar o prevenir las condiciones ejemplares indicadas en la Tabla 9. Las Tablas 1 a 9 se unen en la presente memoria al final de la presente especificación.

En algunas formas de realización, pueden utilizarse las presentes nanopartículas, sistemas de administración de medicamento y composiciones y métodos farmacéuticos para administrar las medicaciones ejemplares indicadas en Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations (vigente hasta marzo de 2012) publicado por la U.S. Food and Drug Administration, las medicaciones ejemplares indicadas en The Merck Index (una publicación estadounidense, la 14a edición impresa, Whitehouse Station, N.J., USA) y su versión en internet (The Merck Index OnlineSM, última carga en internet: Martes, 1 de mayo de 2012) y las medicaciones ejemplares indicadas en Biologics Products & Establishments, publicado por la U.S. Food and Drug Administration, y pueden utilizarse para tratar o prevenir las enfermedades y trastornos correspondientes.

Breve descripción de los dibujos

El experto en la materia entenderá que los dibujos, descritos a continuación, se proporcionan con fines exclusivamente ilustrativos.

Figura 1 Esquema del procedimiento de preparación de las nanopartículas (NP) de PLGA recubiertas con membrana de GR.

Figura 2 Caracterización estructural de las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR. Figura 2A Las nanopartículas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y posteriormente se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Figura 2B Mediciones de dispersión dinámica de la luz (DDL) del tamaño, índice de polidispersividad (IPD) y potencial zeta de superficie de las nanopartículas durante 14 días. Fig 2C Imágenes de microscopía fluorescente de escaneo que demuestran la colocalización

de las membranas de GR (visualizadas con pigmentos de verde rodamina-DMPE) y núcleos poliméricos (visualizados con pigmentos rojo DiD) tras ser internalizadas por células HeLa. Las nanopartículas recubiertas con membrana de GR se incubaron con las células HeLa durante 6 horas. El exceso de nanopartículas se eliminó mediante lavado y las células seguidamente se fijaron para la obtención de imágenes.

Figura 3 Retención de proteínas membranales, estabilidad de las partículas en suero y tiempo de circulación in vivo de las nanopartículas (NP) recubiertas con membrana de GR. Figura 3A Se solubilizaron las proteínas dentro de los GR vacíos, las vesículas derivadas de membranas de GR y las nanopartículas de PLGA recubiertas con membranas de GR purificadas y se resolvieron en un gel de poliácridamida. Figura 3B Se incubaron nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR, nanopartículas híbridas de lípido-PLGA recubiertas con PEG y nanopartículas de PLGA desnudas en suero de feto bovino al 100% y se monitorizaron para absorbancia a 560 nm durante 4 horas. Fig 3C. Las nanopartículas cargadas con DiD se inyectaron por vía intravenosa por la vena de la cola de los ratones. En diversos puntos temporales, se extrajo sangre por vía intraorbital y se midió para fluorescencia a 670 nm a fin de evaluar el tiempo de vida en circulación sistémica de las nanopartículas (n=6 por grupo).

Figura 4 Biodistribuciones de las nanopartículas poliméricas recubiertas con membrana de GR. Se inyectaron por vía intravenosa en los ratones nanopartículas marcadas fluorescentemente. En cada punto temporal (24, 48 y 72 horas, respectivamente), se recogieron los órganos de un subconjunto agrupado aleatoriamente de ratones, se homogeneizaron y se cuantificaron para fluorescencia. Figura 4A Intensidad de fluorescencia por gramo de tejido (n=6 por grupo). Figura 4B Señal relativa según órgano.

Figura 5 Imágenes de microscopía de contraste de fases de glóbulos rojos (GR) de ratón antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) del tratamiento hemolítico en solución hipotónica. Se verificó la carencia de contenido en el interior de los GR (hemoglobinas) por el cambio en el contraste de fases, lo que indica una alteración del medio interior a los GR.

Figura 6 Diámetro medio de las vesículas derivadas de membrana de GR tras la derivación de fantasmas de GR, 5 min de sonicación, extrusión a 400 nm y extrusión a 100 nm medidos mediante dispersión dinámica de la luz (DDL).

Figura 7 Retención de la fluorescencia del pigmento DiD en nanopartículas (NP) híbridas de lípido-PLGA PEGiladas durante un periodo de 72 horas.

Figura 8 Diámetro medio de partícula de nanopartículas (NP) de PLGA antes (izquierda) y después (derecha) del recubrimiento con membrana de GR medido mediante DDL.

Figura 9 Ilustración esquemática de materiales de construcción y procedimiento de preparación de NP recubiertos con membrana de GR (GRm). Se midió mediante DDL el tamaño hidrodinámico de los fantasmas de GR, de las vesículas derivadas de GRm, de los núcleos poliméricos y de las NP cubiertas con GRm.

Figura 10 Rendimientos de carga de doxorubicina (DOX) en las NP cubiertas con GRm a diversas entradas iniciales de fármaco. Se cargaron moléculas de fármaco en las NP mediante dos mecanismos de carga diferentes: encapsulado físico y conjugación química, respectivamente.

Figura 11 Ensayo de estabilidad in vitro de NP con cubierta de GRm cargadas con DOX. Se cargó DOX en las NP mediante conjugación química o el encapsulado físico. Figura 11(A) Estabilidad a largo plazo de NP con cubierta de GRm cargadas con DOX en términos de tamaño de partícula (diámetro, nm) índice de polidispersividad (IPD) en tampón PBS, que se monitorizaron durante un periodo de 7 días a temperatura ambiente. Figura 11(B) Se evaluó la estabilidad de NP con cubierta de GRm cargadas con DOX y núcleos de NP desnudas (sin cubierta de GRm) en FBS al 100% mediante la medición de la absorbancia de UV a una longitud de onda de 560 nm.

Figura 12(A) Perfiles de liberación de DOX de NP con cubierta de GRm y NP PEGiladas. Para estos estudios de liberación, la concentración inicial de DOX dentro de las NP era de 5% en peso para la conjugación química y de 1,8% en peso para el encapsulado físico, respectivamente. Figura 12(B) Para los sistemas de encapsulado físico, se representó gráficamente el porcentaje de liberación de fármaco frente a la raíz cuadrada del tiempo, que rindió ajustes lineales utilizando un modelo de Higuchi de difusión dominante.

Figura 13 Un estudio comparativo de citotoxicidad para la estirpe celular Kasumi-1 establecida a partir de sangre periférica de un paciente de LMA, en la que los cuadrados representan NP con cubierta de GRm con DOX químicamente conjugado; los círculos representan NP con cubierta de GRm con DOX encapsulada físicamente y los triángulos representan DOX libre. Todas las muestras se incubaron con células Kasumi-1 durante 72 horas antes del ensayo de MTT (n=4).

Figura 14 Ilustración esquemática de nanopartícula inmunoestimuladora con cubierta de membrana de célula de cáncer como vacuna de tratamiento de cáncer.

Figura 15 Ilustración de un procedimiento en tres etapas para preparar nanopartículas poliméricas con cubierta de membranas de células de cáncer: síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas de adyuvante, generación de vesículas derivadas de membrana de células de cáncer y fusión de las nanopartículas poliméricas con las vesículas.

Figura 16 Esquema ilustrativo del mecanismo de trabajo de la vacuna propuesta de tratamiento personalizado del cáncer: (i) se recolectan células de cáncer del tumor del paciente individual y se utilizan las membranas naturales de las células de cáncer para cubrir nanopartículas cargadas de adyuvante, (ii) dichas nanopartículas inmunoestimuladoras son incorporadas por células dendríticas inmaduras y, de esta manera, inducen su maduración, (iii) las células dendríticas maduras presentan los antígenos de cáncer a las células T citotóxicas y activan una respuesta inmunológica contra los antígenos, (iv) las células T citotóxicas activadas destruyen el tumor que expresa los antígenos de cáncer específicos.

Figura 17a. Imagen de MET que muestra la estructura de núcleo-cubierta de las nanopartículas de PLGA con cubierta de membrana de célula de cáncer. Figura 17b. Diámetro de nanopartícula medido mediante DDL. Figura 17c. SDS-PAGE del contenido de proteínas y ADN de nanopartículas con cubierta de membrana de célula de cáncer dializadas en comparación con células de cáncer completas. Figura 17d. Imágenes de microscopía de fluorescencia de desconvolución que demuestran la coadministración de materiales membranales y PLGA. La membrana de célula de cáncer se tiñe con pigmento NBD (verde); el núcleo polimérico se carga con pigmento DiD (rojo) y el núcleo se tiñe con DAPI (azul).

Figura 18(A) Esquema de las nanoesponjas de toxina en la neutralización de toxinas formadoras de poro (TFP). Las nanoesponjas consisten en membranas de bicapa de GR soportadas sobre sustrato en las que pueden incorporarse las TFP. Figura 18(B) Visualización de MET de una única nanoesponja en presencia de α -toxina. La muestra se tiñó negativamente en acetato de uranilo (barra de escala=20 nm). Figura 18(C) Visualización de MET de nanoesponjas mezcladas con α -toxina (barra de escala=80 nm).

Figura 19(A) GR centrifugadas tras 30 min de incubación con α -toxina preparada en PBS, nanopartícula de PLGA PEGilada, liposoma PEGilado, vesículas de membrana de GR y soluciones de nanoesponjas de toxina. Cada tubo contenía 5% de GR purificadas, 3 μ g de α -toxina y 200 μ g de la nanoformulación correspondiente en un volumen final de 2 ml de PBS. Figura 19(B) Cuantificación de la hemólisis de GR basada en la absorbancia a 540 nm. Figura 19(C) Se filtraron 200 μ g de las nanoformulaciones mezcladas con 3 μ g de α -toxina y se analizaron mediante SDS-PAGE para la absorción de toxina. Se prepararon 3 μ g de α -toxina no filtrada a modo de referencia. Figura 19(D) Un pigmento lipofílico, DMPE-rodamina (rojo), se incorporó con la nanoformulaciones para indicar las distribuciones de los materiales de membrana tras la incubación con las células. Tras 1 h de incubación con células endoteliales de vena umbilical humana, la distribución amplia del pigmento (izquierda) sugería que las vesículas membranales probablemente se fusionaban con la membrana celular y las partículas claras (derecha) indicaban que los materiales membranales de las nanoesponjas eran incorporados intracelularmente. Figura 19(E) Actividad hemolítica de cantidades variables de α -toxina con o sin mezcla previa con nanoesponjas. Se fijó el contenido global de nanoesponjas en 200 μ g y se examinó la hemólisis en 2 ml de solución de PBS que contenía 5% de GR. Figura 19(F) Inhibición de la hemólisis por α -toxina con cantidades variables de nanoesponjas. Se fijó el contenido global de nanoesponjas en 9 μ g y se examinó la hemólisis en 2 ml de solución de PBS que contenía 5% de GR.

Figura 20 Se inyectaron 150 μ l de α -toxina 12 μ g/ml y la misma formulación neutralizada con 100 μ g de nanoesponjas, en la región del flanco de los ratones por vía subcutánea. Figura 20(A) Se observaron lesiones representativas en la piel de ratones con inyección de toxina 3 días después de la inyección. Figura 20(B) La inyección de toxina neutralizada con nanoesponjas mostró la ausencia de efecto observable en la piel. Figura 20(C) Las secciones histológicas revelaron que la toxina provocaba un infiltrado inflamatorio demostrable, apoptosis, necrosis y edema en la epidermis. (Barra de escala=80 μ m). Figura 20(D) No se observó ninguna anomalía en la epidermis tras la inyección de toxina neutralizada con nanoesponjas. (Barra de escala=80 μ m) Figura 20(E) Los desgarros en fibras musculares, el edema interfibrilar y la extravasación de neutrófilos procedentes de la vasculatura circundante reveló los daños provocados por la toxina en los músculos. (Barra de escala=20 μ m) Figura 20(F) Las estructuras normales de las fibras musculares y la falta de signos inflamatorios sugieren la neutralización de la toxina por las nanoesponjas. (Barra de escala=20 μ m)

Figura 21. Tasas de supervivencia de los ratones durante un periodo de 15 días tras inyecciones intravenosas de 75 μ g/kg de α -toxina (negro); se administraron por vía intravenosa 80 mg/kg de nanoesponjas 2 min después (rojo) o antes (azul) de la inyección de toxina. Se obtuvieron los valores de p utilizando el ensayo de rangos logarítmicos. Los ratones con inyección de toxina presentaron una tasa de supervivencia de 0%; los ratones posinoculados con las nanoesponjas presentaron una tasa de supervivencia de 44% ($p=0,0091$); los ratones preinoculados con las nanoesponjas presentaban una tasa de supervivencia

de 89% ($p < 0,0001$). Todas las inyecciones se llevaron a cabo por la vía intravenosa por la vena de la cola ($n=9$).

Figura 22. Esquema del procedimiento de preparación de las nanoesponjas de toxina.

Figura 23. Ilustración esquemática de nanopartículas recubiertas con membrana para la inmunización activa de toxinas.

Figura 24. Imágenes representativas de ratones inoculados con alfa-hemolisinas estafilocócicas, toxinas desnaturalizadas por calor o toxinas neutralizadas con nanopartículas por vía subcutánea en la región del cuello. 72 horas después de la inoculación, se examinaron los ratones y no se observaron lesiones en la piel en los ratones inoculados con partículas/toxinas.

Figura 25. Tras 3 inoculaciones semanales de toxinas desnaturalizadas por calor o las toxinas neutralizadas con nanopartículas, se extrajo el suero de los ratones inoculados y se examinaron los títulos de anticuerpos contra alfa-hemolisina utilizando ELISA. El grupo de nanopartículas/toxina mostró un título de anticuerpos equivalente al del grupo de toxina desnaturalizada por calor.

Figura 26. El ensayo de hemólisis de glóbulos rojos se llevó a cabo incubando las toxinas en primer lugar con diluciones del suero procedente de los ratones inoculados. La mezcla se mezcló posteriormente con GR y se examinó para actividad hemolítica. El suero de los ratones inoculados con nanopartículas/toxinas mostró una inhibición significativa de la actividad de la toxina.

Figura 27. Los ratones fueron inoculados con alfa-hemolisina neutralizada con nanopartículas semanalmente 3 veces antes de someterlos a reto de toxina en los que se inyectó por vía intravenosa una dosis letal de alfa-hemolisinas. En los ratones no inmunizados se inyectó la misma dosis de toxina a modo de control. Los ratones inmunizados con partículas/toxinas mostraron una supervivencia de 100% en la marca de las 72 horas mientras que ninguno de los ratones no inmunizados sobrevivió más allá de la marca de las 6 h ($n=10$).

Figura 28. Ilustración esquemática de nanopartículas recubiertas con membrana para la neutralización de toxinas.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de nanotecnología, nanoingeniería, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, inmunología y farmacología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición (Sambrook et al., 1989; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984)); Animal Cell Culture (R.L. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., editores, 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994) y Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20a ed., (Lippincott, Williams & Wilkins 2003).

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. En el caso de que una definición proporcionada en la presente sección sea contraria o, de otro modo, inconsistente con una definición proporcionada en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria, la definición proporcionada en la presente sección prevalece sobre la definición presente en la referencia.

Con el fin de facilitar la comprensión de la invención, se definen varios términos y abreviaturas tales como los utilizados en la presente memoria a continuación:

Al introducir elementos de la presente invención o la forma de realización o formas de realización preferentes de los mismos, los artículos "un", "una", "el", "la" y "dicho" o "dicha" pretenden referirse a la existencia de uno o más elementos. Los términos "comprendiendo", "incluyendo" y "presentando" pretenden ser inclusivos y se refieren a que pueden existir elementos adicionales diferentes de los elementos indicados.

El término "y/o" cuando se utiliza en una lista de dos o más ítems, se refiere a que cualquiera de los ítems listados puede utilizarse por sí mismo o en combinación con uno o más cualesquiera de los ítems en la lista. Por ejemplo, la expresión "A y/o B" pretende referirse a uno cualquiera de A y B o ambos, es decir, A solo, B solo o A y B en combinación. La expresión "A, B y/o C" pretende referirse a A solo, B solo, C solo, A y B en combinación, A y C en combinación, B y C en combinación, o A, B y C en combinación.

Membrana celular: la expresión "membrana celular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una

membrana biológica que es una estructura delimitadora o separadora que actúa como una barrera selectiva, dentro o en torno a una célula o a una partícula vírica emergente. La membrana celular es selectivamente permeable a iones y moléculas orgánicas y controla el movimiento de sustancias de entrada y salida de las células. La membrana celular comprende una unicapa o bicapa lipídica, y opcionalmente proteínas y carbohidratos asociados. Tal como se utiliza en la presente memoria, la membrana celular se refiere a una membrana obtenida de una membrana biológica natural de una célula u orgánulos celulares, o una derivada de los mismos. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de presencia natural" se refiere a que existe en la naturaleza. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "derivado a partir del mismo" se refiere a cualquier modificación posterior de la membrana natural, tal como aislar la membrana celular, crear porciones o fragmentos de la membrana, eliminar y/o añadir determinados componentes, tales como lípidos, proteínas o carbohidratos, desde o hacia el interior de la membrana obtenida de una célula o de un orgánulo celular. Una membrana puede derivarse de una membrana de presencia natural mediante cualesquiera métodos adecuados. Por ejemplo, puede prepararse o aislarse una membrana a partir de una célula o de un virus y la membrana preparada o aislada puede combinarse con otras sustancias o materiales para formar una membrana derivada. En otro ejemplo, una célula o virus puede manipularse recombinantemente para producir sustancias "no naturales" que se incorporan en su membrana in vivo, y la membrana celular o vírica puede prepararse o aislarse a partir de la célula o virus para formar una membrana derivada.

En diversas formas de realización, la membrana celular que cubre las nanopartículas unilamelares o multilamelares puede modificarse adicionalmente para que se encuentre saturada o insaturada con otros componentes lipídicos, tales como colesterol, ácidos grasos libres y fosfolípidos, puede incluir además proteínas y carbohidratos endógenos o añadidas, tales como antígeno de superficie celular. En dichos casos, puede añadirse una cantidad en exceso de los demás componentes lipídicos a la pared membranal que serán expulsados hasta que la concentración en la pared membranal alcance un equilibrio, que puede ser dependiente del medio de las nanopartículas. Las membranas pueden comprender además otros agentes que pueden incrementar o no una actividad de la nanopartícula. En otros ejemplos, pueden añadirse grupos funcionales, tales como anticuerpos y aptámeros, a la superficie externa de la membrana para potenciar el direccionamiento a sitio, tal como a epítomos de la superficie celular presentes en las células de cáncer. La membrana de las nanopartículas puede comprender además partículas que pueden ser biodegradables, nanopartículas catiónicas, incluyendo, aunque sin limitación, nanopartículas de oro, plata y sintéticas.

Membrana sintética o artificial: Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "membrana sintética" o "membrana artificial" se refiere a una membrana hecha por el hombre que es producida a partir de material orgánico, tal como polímeros y líquidos, así como materiales inorgánicos. Una amplia diversidad de membranas sintéticas es bien conocida de la técnica.

Membrana vírica: Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "membrana derivada de un virus" se refiere a cubiertas víricas que cubren el ácido nucleico o cápside proteica de un virus y típicamente contienen proteínas de la membrana celular derivadas de porciones de la membrana de la célula huésped (fosfolípidos y proteínas) e incluyen algunas glucoproteínas víricas. La cubierta vírica se fusiona con la membrana del huésped, permitiendo que la cápside y el genoma vírico entren e infecten el huésped.

Nanopartícula: el término "nanopartícula" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una nanoestructura, partícula, vesícula o fragmento de las mismas que presenta por lo menos una dimensión (p.ej., altura, longitud, anchura o diámetro) entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 10 µm. Para el uso sistémico, puede resultar preferente un diámetro promedio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm, o 100 nm a 250 nm. El término "nanoestructuras" incluye, aunque no necesariamente con limitación, partículas y elementos construidos. Las partículas y elementos construidos pueden presentar, por ejemplo, una forma regular o irregular. Dichas partículas también se denominan nanopartículas. Las nanopartículas pueden estar compuestas de materiales orgánicos u otros materiales, y alternativamente pueden implementarse con partículas porosas. La capa de nanopartículas puede implementarse con nanopartículas en una monocapa o con una capa que presenta aglomeraciones de nanopartículas. Tal como se utiliza en la presente memoria, la nanopartícula consiste en un núcleo interno cubierto por una superficie externa que comprende la membrana tal como se comenta en la presente memoria. La invención contempla cualesquiera nanopartículas actualmente conocidas y posteriormente desarrolladas que puedan recubrirse con la membrana descrita en la presente memoria.

Farmacéuticamente activo: La expresión "farmacéuticamente activo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la actividad biológica beneficiosa de una sustancia sobre materia viva y, en particular, sobre células y tejidos del cuerpo humano. Un "agente farmacéuticamente activo" o "fármaco" es una sustancia que es farmacéuticamente activa y un "ingrediente farmacéuticamente activo" (IFA) es la sustancia farmacéuticamente activa en un fármaco.

Farmacéuticamente aceptable: la expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o indicado en la Farmacopea US, otras farmacopeas generalmente reconocidas además de otras formulaciones que son seguras

para la utilización en animales, y más particularmente en el ser humano y/o en mamíferos no humanos.

Sal farmacéuticamente aceptable: la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sales de adición de ácido o sales de adición de base del compuesto, tal como los conjugados multifármaco, en la presente exposición. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que conserva la actividad del compuesto parental y que no proporciona ningún efecto perjudicial o no deseable a un sujeto en el que se administra y en el contexto en que se administra. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden derivarse de aminoácidos, incluyendo, aunque sin limitación, cisteína. Los métodos para producir compuestos en forma de sales son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Stahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH; Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2002; Berge et al., J Pharm. Sci. 66: 1, 1977). En algunas formas de realización, una "sal farmacéuticamente aceptable" pretende referirse a una sal de un ácido o base libre de un compuesto representado en la presente memoria que resulta no tóxico, biológicamente tolerable o de otro modo biológicamente adecuado para la administración en el sujeto. Ver, generalmente, Berge et al., J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977. Las sales farmacéuticamente aceptables preferentes son aquellas que son farmacológicamente activas y adecuadas para el contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad indebida, irritación o respuesta alérgica. Un compuesto descrito en la presente memoria puede poseer un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico, ambos tipos de grupo funcional, o más de uno de cada tipo, y de acuerdo con ello reaccionan con varias bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

Entre los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos monohidrógeno-fosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butín-1,4-dioatos, hexín-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, metilsulfonatos, propilsulfonatos, besilatos, xilenosulfonatos naftalén-1-sulfonatos, naftalén-2-sulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ -hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos y mandelatos.

Portador farmacéuticamente aceptable: la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un excipiente, diluyente, conservante, solubilizador, emulsionante, adyuvante y/o vehículo con el que se administra un compuesto, tal como un conjugado multifármaco. Dichos portadores pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos. Los agentes antibacterianos, tales como el alcohol bencílico o los metilparabenos; los antioxidantes, tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; los agentes quelantes, tales como el ácido etilén-diamina-tetraacético y los agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como el cloruro sódico o la dextrosa también pueden ser un portador. Los métodos para producir composiciones en combinación con portadores son conocidos por el experto en la materia. En algunas formas de realización, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica. Ver, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20a ed., (Lippincott, Williams & Wilkins, 2003). Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones.

Fosfolípido: El término "fosfolípido", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquiera de entre numerosos lípidos que contienen un diglicérido, un grupo fosfato y una molécula orgánica simple, tal como colina. Entre los ejemplos de fosfolípidos se incluyen, aunque sin limitación, ácido fosfatídico (fosfatidato) (PA), fosfatidiletanlamina (cefalina) (PE), fosfatidilcolina (lecitina) (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfoinositidas, que incluyen, aunque sin limitación, fosfatidilinositol (PI), fosfato de fosfatidilinositol (PIP), bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) y trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3). Entre los ejemplos adicionales de PC se incluyen DDPC, DLPC, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC, POPC, DRPC y DEPC, tal como se definen en la técnica.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquellas cantidades que, administradas en un sujeto particular en vista de la naturaleza y severidad de la enfermedad o condición de dicho sujeto, presentará un efecto terapéutico deseado, por ejemplo una cantidad que curará, prevendrá, inhibirá o por lo menos detendrá parcialmente o prevendrá parcialmente una enfermedad o condición diana. Más formas de realización específicas se encuentran incluidas en la sección titulada Preparaciones farmacéuticas y métodos de administración, posteriormente. En algunas formas de realización, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que, administrada solo o en combinación con un agente terapéutico adicional en una célula, tejido o sujeto, resulta eficaz para prevenir o mejorar la enfermedad o condición, tal como una infección o el avance de la enfermedad o condición. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a

aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para resultar en la mejora de los síntomas, por ejemplo, el tratamiento, la curación, la prevención o la mejora de la condición médica relevante, o un incremento de la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas condiciones. En la aplicación a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a dicho ingrediente solo. Aplicado a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, administrado en combinación, en serie o simultáneamente.

Vacuna: una composición capaz de inducir en un paciente una respuesta inmunológica activa o pasiva beneficiosa a un antígeno específico. Aunque puede desearse una inmunidad protectora, se entiende que pueden resultar beneficiosos diversos niveles de respuesta inmunológica temporal.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere al tratamiento terapéutico, en el que el objetivo es enlentecer (disminuir) o curar la condición o trastorno patológico diana o evitar la recurrencia de la condición. Un sujeto se "trata" con éxito en el caso de que, después de recibir una cantidad terapéutica de un agente terapéutico, muestre una reducción observable y/o medible en o ausencia de uno o más signos y síntomas de la enfermedad particular. La reducción de los signos o síntomas de una enfermedad también puede ser percibida por el paciente. Un paciente también se considera tratado en el caso de que el paciente experimenta una enfermedad estable. En algunas formas de realización, el tratamiento con un agente terapéutico resulta eficaz para resultar en que el paciente se encuentre libre de enfermedad 3 meses después del tratamiento, preferentemente 6 meses después, más preferentemente un año después, todavía más preferentemente 2 o más años después del tratamiento. Los parámetros anteriormente indicados para evaluar el tratamiento y la mejora con éxito de la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios que resultarán familiares al médico experto en la materia.

El término "combinación" se refiere a una combinación fija en una forma de administración unitaria, o un kit de partes para la administración combinada en el que un compuesto y una pareja de combinación (p.ej. otro fármaco, tal como se explica posteriormente, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") pueda administrarse independientemente de manera simultánea o separada en intervalos de tiempo, especialmente en el caso de que dichos intervalos de tiempo permiten que las parejas de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo sinérgico. Las expresiones "coadministración" o "administración combinada" o similar tal como se utilizan en la presente memoria pretenden comprender la administración de la pareja de combinación seleccionada en un único sujeto que lo necesita (p.ej. un paciente) y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o simultáneamente. La expresión "combinación farmacéutica" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. La expresión "combinación fija" se refiere a que los ingredientes activos, por ejemplo un compuesto y una pareja de combinación, se administran ambos en un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosis. La expresión "combinación no fija" se refiere a que los ingredientes activos, por ejemplo un compuesto y una pareja de combinación, se administran ambos en un paciente como entidades separadas simultánea, concurrente o secuencialmente sin límites temporales específicos, en el que dicha administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Lo anterior se aplica además a la terapia de cóctel, por ejemplo la administración de tres o más ingredientes activos.

Se entiende que los aspectos y formas de realización de la invención descritos en la presente memoria incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y formas de realización.

Durante la totalidad de la presente exposición, se presentan diversos aspectos de la presente invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo se proporciona meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la descripción de un intervalo debe considerarse que da a conocer específicamente todos los subintervalos posibles, así como valores numéricos individuales dentro de dicho intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como entre 1 y 6 debe considerarse que da a conocer específicamente subintervalos tales como entre 1 y 3, entre 1 y 4, entre 1 y 5, entre 2 y 4, entre 2 y 6, entre 3 y 6, etc., así como números individuales dentro de dicho intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Lo anterior se aplica con independencia de la amplitud del intervalo.

Otros objetivos, ventajas y elementos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la especificación a continuación, considerada junto con los dibujos adjuntos.

La invención se refiere a una nanopartícula que comprende:

a) un núcleo interno que comprende un material no celular y

b) una superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula humana o animal,

en la que dicho núcleo interno proporciona soporte a la superficie externa y comprende un material biocompatible o sintético seleccionado de entre el grupo que consiste en poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina y ácido poliglutámico.

5 La presente invención proporciona nuevas nanopartículas y métodos de utilización y preparación de las mismas. Más específicamente, la nanopartícula inventiva comprende: a) un núcleo interno que comprende un material no celular y b) una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula.

10 En determinadas formas de realización, el núcleo interno de la nanopartícula inventiva soporta la superficie externa y puede ser de cualquier forma, incluyendo, aunque sin limitación, esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo, cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto y otras formas regulares e irregulares. El material no celular del núcleo interno comprende un material sintético biocompatible, que incluye poli (ácido láctico-co-glicólico), ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, polilisina o ácido poliglutámico.

15 En determinadas formas de realización, la membrana de la superficie externa de la nanopartícula de la invención comprende una membrana celular presente naturalmente derivada de la membrana plasmática de una célula procedente de organismos multicelulares (p.ej., un animal, un mamífero no humano o un ser humano). La membrana plasmática celular presente naturalmente mantiene la integridad estructural y actividad naturales de la membrana. Por ejemplo, la estructura de bicapa lipídica y por lo menos algunas de las proteínas membranales asociadas incluidas en la misma están intactas, de manera que el encapsulado membranal no presenta sustancialmente inmunogenicidad para la especie o sujeto a partir del cual se deriva la membrana.

20 En determinadas formas de realización, la célula incluye, aunque sin limitación, una célula sanguínea, tal como un glóbulo rojo (GR), un glóbulo blanco (GB) y una plaqueta, una célula inmunológica, tal como un macrófago, un monocito, una célula B y una célula T, una célula de tumor o de cáncer, y otras células, tales como una célula epitelial, una célula endotelial y una célula neural. En otras formas de realización, la membrana de la superficie externa se deriva de células troncales no diferenciadas terminalmente o pluripotentes, tales como una célula troncal hematopoyética, una célula troncal de médula ósea, una célula troncal mesenquimal, una célula troncal cardíaca o una célula troncal neural. En todavía otras formas de realización, la membrana celular se deriva de un componente celular, incluyendo, aunque sin limitación, un exosoma, una vesícula secretoria o una vesícula sináptica. En determinadas formas de realización, la superficie externa de la nanopartícula de la presente invención comprende además una membrana sintética o componentes sintéticos, junto con la membrana de origen natural.

35 Las membranas según la invención pueden obtenerse y ensamblarse mediante métodos descritos en la presente memoria y conocidos de la técnica; ver Desilets et al., *Anticancer Res.* 21: 1741-47; Lund et al., *J Proteome Res.* 8 (6), 3078-3090, 2009; Graham, *Methods Mol. Biol.* 19:97-108, 1993; Vayro et al., *Biochem J.* 279:(Pt 3), 843-848, 1991; Navas et al., *Cancer Res.* 49 (8), 2147-2156, 1989; Henon et al., *C R Acad. Sci. Hebd Seances Acad Sci D* 285 (1):121-122, 1977 y Boone et al., *J. Cell Biol.* 41 (2):378-392, 1969.

40 La presente invención proporciona además que la nanopartícula de la invención comprende una carga liberable que puede localizarse en cualquier sitio en el interior o sobre la superficie de la nanopartícula. En determinadas formas de realización, la carga liberable se encuentra situada dentro o sobre el núcleo interno de la nanopartícula inventiva. En otras formas de realización, la carga liberable se encuentra situada entre el núcleo interno y la superficie externa de la nanopartícula inventiva. En todavía otras formas de realización, la carga liberable se encuentra situada dentro o sobre la superficie externa de la nanopartícula inventiva. Un inductor para liberar la carga liberable a partir de la nanopartícula inventiva incluye, aunque sin limitación, el contacto entre la nanopartícula y una célula, tejido, órgano o sujeto diana, o un cambio en un parámetro ambiental, tal como el pH, la condición iónica, la temperatura, la presión y otros cambios físicos o químicos, circundantes a la nanopartícula.

45 En determinadas formas de realización, la carga liberable comprende uno o más de un agente terapéutico, un agente profiláctico, un agente diagnóstico o marcador, un agente pronóstico, o una combinación de los mismos. Entre los ejemplos de agentes terapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un antibiótico, un antimicrobiano, un factor de crecimiento, un agente quimioterapéutico o una combinación de los mismos. Un agente diagnóstico o pronóstico ejemplar puede ser un marcador de imágenes. En todavía otras formas de realización determinadas, la carga liberable es una partícula metálica que comprende una partícula de oro, una partícula de plata o una partícula de óxido de hierro. En otras formas de realización, la carga liberable es una partícula polimérica que comprende una partícula de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PCL), una partícula de quitosano, una partícula de copolímero de hidroxipropil-metacrilamida (HPMA). En otras formas de realización, la carga liberable es una partícula dendrímico o una partícula inorgánica que comprende una partícula de sílice, una partícula de sílice porosa, una partícula de fosfato de calcio o un punto cuántico, o una partícula metálica que comprende una partícula de oro, una partícula de plata o una partícula de óxido de hierro.

60 La presente invención proporciona además que la nanopartícula inventiva sea de cualquier forma adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo,

cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto u otra forma regular o irregular, y presente un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 10 µm. En determinadas realizaciones, dicha nanopartícula de la invención presenta un diámetro de aproximadamente 50 nm y aproximadamente 500 nm.

5 La presente invención proporciona además que la nanopartícula de la invención no presente sustancialmente constituyentes de la célula a partir de los que se deriva la membrana celular. En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la presente invención no presenta sustancialmente citoplasma, núcleo y/o orgánulos celulares de la célula a partir de la cual se deriva la membrana celular. En todavía otras formas de
10 realización determinadas, la nanopartícula de la presente invención mantiene sustancialmente la integridad estructural o actividad naturales de la membrana celular, o de los constituyentes de la membrana celular. La integridad estructural de la membrana celular incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la membrana celular o de los constituyentes de la membrana celular, y la actividad de la membrana celular incluye, aunque sin limitación, la actividad de unión, la actividad de receptor, la actividad de ruta de señalización, y cualesquiera otras actividades que pueda presentar una membrana celular natural normal o los constituyentes
15 de la membrana celular. En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la presente invención es biocompatible y/o biodegradable.

20 En determinadas formas de realización, la nanopartícula de la presente invención comprende la membrana plasmática celular derivada de un glóbulo rojo y un núcleo interno que comprende poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), en la que la nanopartícula no presenta sustancialmente hemoglobina y presenta una semivida en circulación sanguínea in vivo por lo menos aproximadamente 2 a 5 veces la semivida de una nanopartícula que presenta un núcleo interno de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) recubierto con polietilenglicol (PEG). En determinadas formas de realización, dicha nanopartícula presenta una semivida en la circulación sanguínea in vivo de por lo menos aproximadamente 5 a aproximadamente 40 horas.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un sistema de administración de medicamento que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula de la presente invención. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención
30 comprende además uno o más ingredientes activos adicionales, con o sin un portador excipiente médica o farmacéuticamente aceptable, que puede administrarse junto con o en combinación con la nanopartícula de la presente invención.

35 En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición inmunógena específica de neoplasma que comprende nanopartículas recubiertas con una membrana celular derivada de células de cáncer, tal como una célula de neoplasma benigno, una célula de neoplasma potencialmente maligno, una célula de tumor o de cáncer de un sujeto o estirpe celular, con integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica contra la célula de neoplasma o de cáncer. En otras formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una vacuna de cáncer que
40 comprende la composición inmunógena específica de neoplasma.

En otras formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención comprende nanopartículas que comprenden una toxina de inserción en la membrana celular, en la que la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula se deriva de una célula diana o de un componente celular o intracelular, y conserva
45 una toxina de una fuente bacteriana, fúngica o animal. En determinadas formas de realización, la célula diana incluye, aunque sin limitación, una célula sanguínea, tal como un glóbulo rojo (GR), un glóbulo blanco (GB) y una plaqueta, una célula inmunológica, tal como un macrófago, un monocito, una célula B y una célula T, una célula de tumor o de cáncer, y otras células, tales como una célula epitelial, una célula endotelial y una célula neural, o células troncales no diferenciadas terminalmente o pluripotentes, tales como una célula troncal hematopoyética, una célula troncal de médula ósea, una célula troncal mesenquimal, una célula troncal cardíaca o una célula troncal neural. En determinadas realizaciones, la célula diana es un glóbulo rojo. En otras formas de realización, el componente intracelular incluye, aunque sin limitación, exosomas, vesículas secretorias o vesículas sinápticas. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica es una composición inmunógena que
50 comprende nanopartículas con membrana celular de recubrimiento de la superficie externa que conserva la integridad estructural para conservar la toxina o para inducir una respuesta inmunológica contra una toxina natural. En otras formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención es una vacuna que
55 comprende la composición inmunógena.

60 La composición farmacéutica inventiva o el sistema de administración de medicamento que comprende la nanopartícula de la presente invención puede administrarse mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, la vía oral, nasal, por inhalación, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, tópica o rectal.

65 La presente invención proporciona además un método para inducir una respuesta inmunológica contra una célula diana de un sujeto que lo necesita. El método inventivo comprende administrar en el sujeto que necesita una cantidad eficaz de una composición farmacéutica o un sistema de administración de medicamento que

- comprende la nanopartícula de la presente invención, en la que la membrana celular de la nanopartícula administrada conserva sustancialmente la integridad estructural para inducir la respuesta inmunológica contra la célula diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la célula diana se refiere a cualesquiera células diana, incluyendo, aunque sin limitación, células sanguíneas (p.ej., GR, GB o plaquetas), células inmunológicas (p.ej., 5 células B, células T, macrófagos o monocitos), células de tumor o de cáncer (p.ej., una célula de neoplasma benigno, una célula de neoplasma maligno) o células troncales (p.ej., una célula troncal hematopoyética, una célula troncal de médula ósea, una célula troncal mesenquimal, una célula troncal cardíaca o una célula troncal neural). En determinadas realizaciones, la célula diana es un glóbulo rojo. En otras formas de realización, la célula diana es un neoplasma o célula de cáncer. En determinadas formas de realización, la respuesta 10 inmunológica es una respuesta inmunológica activa. En otras formas de realización, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica pasiva. En todavía otras formas de realización, la respuesta inmunológica es la vacunación protectora. En determinadas formas de realización, la vacunación es una vacunación específica de neoplasma o cáncer.
- 15 La presente invención proporciona además un método para inducir una respuesta inmunológica contra una toxina de inserción en la membrana celular en un sujeto que lo necesita. El método inventivo comprende administrar en el sujeto que lo necesita, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica o de un sistema de administración de medicamento que comprende la nanopartícula de la presente invención, en la que la membrana celular de la nanopartícula administrada conserva la toxina y la integridad estructural natural de la 20 toxina tal como se encuentra unida, para la administración en una célula diana para inducir la respuesta inmunológica contra la célula diana. En determinadas formas de realización, la célula diana es un glóbulo rojo y la toxina es una toxina bacteriana, fúngica o animal. En determinadas formas de realización, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica activa. En otras formas de realización, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica pasiva. En todavía otras formas de realización, la respuesta inmunológica es la 25 vacunación protectora.
- La presente invención proporciona además que los métodos inventivos puedan utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o condición en un sujeto que lo necesita; dicha enfermedad o condición incluye, aunque sin limitación, una enfermedad infecciosa, una enfermedad parasitaria, un neoplasma, una enfermedad 30 de la sangre o de órganos formadores de sangre, un trastorno que implique un mecanismo inmunológico, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, un trastorno mental y del comportamiento, una enfermedad del sistema nervioso, una enfermedad del ojo y anejos, una enfermedad del oído y proceso mastoideo, una enfermedad del sistema circulatorio, una enfermedad del sistema respiratorio, una enfermedad del sistema digestivo, una enfermedad de la piel y tejido subcutáneo, una enfermedad del sistema músculo-esquelético y tejido conectivo, una enfermedad del sistema genitourinario, el embarazo, el parto y el puerperio, 35 una condición originada en el periodo perinatal, una malformación congénita, una deformación, una anomalía cromosómica, una lesión, un envenenamiento, una consecuencia de causas externas y una causa externa de morbilidad y mortalidad.
- 40 En determinadas formas de realización, el método inventivo se utiliza para tratar o prevenir enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patogénicos, tales como bacterias, virus, parásitos u hongos. En otras formas de realización, el método inventivo se utiliza para tratar o prevenir el cáncer o una condición de neoplasma. Tal como se utiliza en la presente memoria, un sujeto necesitado se refiere a un animal, a un mamífero no humano o a un ser humano. Tal como se utiliza en la presente memoria, "animales" incluye un animal de compañía, un animal de granja, un animal económico, un animal de competición y un animal 45 experimental, tal como un gato, un perro, un caballo, una vaca, un buey, un cerdo, un burro, una oveja, un cordero, una cabra, un ratón, un conejo, un pollo, un pato, un ganso, un primate, incluyendo un mono y un chimpancé. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la nanopartícula utilizada para el método inventivo se deriva de una célula de la misma especie del sujeto. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la nanopartícula utilizada para el método inventivo se deriva de un glóbulo rojo de la misma especie del sujeto y el glóbulo rojo presenta el mismo tipo sanguíneo del sujeto. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la nanopartícula utilizada para el método inventivo se deriva de una célula 50 de la misma especie del sujeto.
- 55 La presente invención proporciona además que los métodos inventivos para inducir una respuesta inmunológica contra una célula diana de un sujeto o para tratar o prevenir una enfermedad, trastorno o condición comprenden administrar en el sujeto que necesita otro u otros ingredientes activos con o sin un portador, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable junto con, o en combinación con, la composición farmacéutica o el sistema de administración de medicamento que comprende las nanopartículas de la presente invención. Los 60 métodos inventivos proporcionan además que la nanopartícula de la presente invención se administra en un sitio diana del sujeto que lo necesita, incluyendo, aunque sin limitación, un sitio dérmico, sangre o plasma diana, un órgano diana, un sitio tumoral diana, o células diana, y proporciona además un mecanismo para inducir la liberación de una carga liberable en el sitio diana. Entre los mecanismos para inducir la carga liberable se incluyen, aunque sin limitación, el contacto entre la nanopartícula de la presente invención y una célula, tejido, 65 órgano o sujeto diana, o un cambio en un parámetro ambiental, tal como el pH, la condición iónica, la temperatura, la presión y otros cambios físicos o químicos, circundantes a la nanopartícula de la presente

invención.

La presente invención proporciona además un método para preparar la nanopartícula, así como la composición farmacéutica o sistema de administración de medicamento que comprende las nanopartículas del mismo. Dicho método inventivo de generación de la nanopartícula comprende: a) combinar un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana derivada de una célula y opcionalmente, una membrana sintética, y b) ejercer energía exógena sobre la combinación para formar una nanopartícula, en la que el núcleo interno soporta la superficie externa. En determinadas formas de realización, la energía exógena es una energía mecánica ejercida mediante extrusión. En otras formas de realización, la energía exógena es una energía acústica ejercida mediante sonicación. En todavía otras formas de realización, la energía exógena es una energía térmica ejercida mediante calentamiento. El presente método inventivo contempla cualquier otro sistema de administración de energía exógeno adecuado actualmente existente o desarrollado posteriormente que se utilice en la formación de una nanopartícula.

15 Composición o vacuna inmunógena específica de cáncer

La presente invención proporciona una composición inmunógena específica de neoplasma que comprende una cantidad eficaz de una nanopartícula, que comprenden un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula de neoplasma y opcionalmente también una membrana sintética. En determinadas formas de realización, la membrana celular se deriva de una célula de neoplasma benigno, de una célula de neoplasma potencialmente maligno o de una célula de cáncer. En determinadas formas de realización, la membrana celular se deriva de una estirpe celular de cáncer. En otras formas de realización, la membrana celular se deriva de una célula de cáncer de un sujeto. La composición inmunógena específica de neoplasma de la presente invención puede proporcionar además que la membrana celular en la superficie externa de la nanopartícula conserve sustancialmente su integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica contra la célula de neoplasma. Tal como se utiliza en la presente memoria, la integridad estructural incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la membrana celular o de sus constituyentes.

En determinadas formas de realización, el núcleo interno comprende un material biocompatible o sintético, y soporta la superficie externa de la nanopartícula. El material del núcleo interno incluye poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina o ácido poliglútamico. En determinadas formas de realización, el núcleo interno comprende PLGA y la superficie externa comprende una membrana plasmática derivada de una célula de neoplasma.

En determinadas formas de realización, la composición inmunógena específica de neoplasma de la presente invención comprende la nanopartícula que comprende además uno o más ingredientes activos o una carga liberable, y puede ser de cualquier forma, incluyendo, aunque sin limitación, esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo, cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto y otras formas regulares e irregulares. El diámetro de la nanopartícula puede ser de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 µm. En determinadas formas de realización, el diámetro de la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma es de aproximadamente 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm y 10 µm. En determinadas formas de realización, la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma no presenta sustancialmente constituyentes de la célula de neoplasma a partir de los que se deriva la membrana celular.

La presente invención proporciona además que la composición inmunógena específica de neoplasma comprende además un adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "adyuvante inmunogénico" es una sustancia o composición que puede inducir y/o potenciar una respuesta inmunológica contra un antígeno. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "inmunopotenciador" se refiere a un agente que tras la inoculación potencia la respuesta inmunológica. La presente invención contempla cualquier adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador adecuado actualmente conocido o posteriormente desarrollado, y el tiempo de adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador utilizado junto con, o en combinación con, la nanopartícula de la presente invención no se encuentra particularmente limitado. Puede ser un adyuvante inmunogénico ejemplar, el adyuvante completo de Freund, que es una mezcla de aceite mineral ligero, detergen Arlacel y bacilos inactivados de *Mycobacterium tuberculosis*. Entre los inmunopotenciadores ejemplares se incluyen el bacilo Calmette-Guérin (BCG), *Corynebacterium parvum*, extracto de *Brucella abortus*, glucano, levamisol, tilorona, un enzima y un virus no virulento.

La presente invención proporciona además una vacuna que contiene la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada y un antígeno. En determinadas formas de realización, el antígeno consiste en un tipo o dos o más tipos de antígenos seleccionados de entre el grupo que consiste en tejidos tumorales, células tumorales, ingredientes de célula tumoral, proteínas antígenos tumorales y péptidos antígenos tumorales, y que está destinado a la utilización en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un tumor. En el

caso de que se utilice una proteína foránea como antígeno, los anticuerpos dirigidos contra el antígeno pueden producirse eficientemente en un mamífero diferente de un ser humano con la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada. Por lo tanto, la presente invención proporciona un animal productor de anticuerpos y una célula productora de anticuerpos o gen de anticuerpo derivado del animal

5 productor de anticuerpos. Por lo tanto, la presente invención proporciona una vacuna tumoral que comprende la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada, para la administración en un tejido tumoral de un sujeto, que incluye un ser humano, para inducir una respuesta inmunológica antitumoral en el cuerpo vivo del mamífero.

10 La presente invención proporciona además un método para inducir una respuesta inmunológica sistémica o antitumoral, resultando de esta manera en el tratamiento o la prevención de un neoplasma en un sujeto, en el que dicho método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada o una vacuna de la misma, en un sujeto que lo necesita, en el que la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula en la composición inmunógena específica

15 de neoplasma anteriormente mencionada o vacuna conserva sustancialmente su integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica contra la célula de neoplasma. Tal como se utiliza en la presente memoria, la respuesta inmunológica puede ser una respuesta inmunológica mediada por células T y/o una respuesta inmunológica mediada por células B. Tal como se utiliza en la presente memoria, el neoplasma se refiere a un neoplasma benigno, un neoplasma potencialmente maligno o un cáncer. En determinadas formas de realización, el neoplasma es un cáncer y el tipo de cáncer que puede tratarse o prevenirse mediante el método inventivo no se encuentra limitado.

20 En determinadas formas de realización, la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada o vacuna se deriva de una estirpe de células de cáncer o una célula de cáncer de la misma especie o de una especie diferente del sujeto, o el mismo sujeto o un sujeto diferente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "sujeto" se refiere a un mamífero no humano, un animal o un ser humano.

25 La presente invención proporciona además la administración en el sujeto que lo necesita, de otro u otros ingredientes activos, con o sin un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, junto con, o en combinación con, la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada o vacuna. La composición inmunógena específica de neoplasma o la vacuna de la presente invención, así como los demás ingredientes activos, pueden administrarse, solos o en combinación, mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, la vía oral, nasal, por inhalación, parenteral, intravenosa,

30 intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, tópica o recta. En determinadas formas de realización, la composición inmunógena específica de neoplasma o la vacuna de la presente invención, así como los demás ingredientes activos, se administra mediante un sistema de administración de medicamento en el sujeto que lo necesita. El tipo de vía de administración o el tipo de otro ingrediente activo utilizado en la presente memoria no se encuentran particularmente limitados.

40 Tratamiento de una enfermedad o condición asociada a toxinas de inserción en la membrana celular

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana celular, en la que la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de una nanopartícula, que comprende un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula diana,

45 y opcionalmente, también una membrana sintética. En determinadas formas de realización, el núcleo interno soporta la superficie externa y comprende un material biocompatible o un material sintético. El material biocompatible o sintético incluye poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina o ácido poliglútamico.

50 En determinadas formas de realización, la membrana celular es una membrana plasmática derivada de glóbulos rojos y en la que la membrana celular o la membrana plasmática en la superficie externa de la nanopartícula conserva sustancialmente su integridad estructural para conservar sustancialmente la toxina. En determinadas formas de realización, la toxina se inserta en la membrana celular o membrana plasmática de la célula diana como parte del mecanismo patológico natural.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, la "toxina" se refiere a un material o producto tóxico de plantas, animales, microorganismos (incluyendo, aunque sin limitación, bacterias, virus, hongos, *Rickettsiae* o protozoos) o sustancias infecciosas, o una molécula recombinante o sintetizada, con independencia de su origen y método de producción. En determinadas formas de realización, la "toxina" incluye una toxina bacteriana, fúngica o animal producida dentro de células u organismos vivos.

60 En determinadas formas de realización, la toxina bacteriana incluye exotoxina y endotoxina. Tal como se utiliza en la presente memoria, las "exotoxinas" son generadas por las bacterias y activamente secretadas, mientras que las "endotoxinas" son parte de la bacteria misma (p.ej. la membrana externa de la bacteria) y no resultan

5 liberadas hasta que la bacteria es eliminada por el sistema inmunológico. La presente invención contempla cualquier exotoxina o endotoxina actualmente conocida o por descubrir en el futuro. El tipo de toxina bacteriana insertada en la membrana celular no se encuentra particularmente limitado. En determinadas formas de realización, la toxina bacteriana es una toxina de inserción en la membrana celular de *S. aureus*, tal como la alfa-hemolisina.

10 La presente invención contempla además cualesquiera toxinas fúngicas actualmente conocidas y descubiertas en el futuro, incluyendo, aunque sin limitación, aflatoxina, citrinina, ergotamina, fumonisinas, ergovalina, ocratoxina, fomopsina, slaframina, esporidesmina, tricotecenos (p.ej., satratoxina, desoxinivalenol) y zearalenona. El tipo de toxina fúngica insertada en la membrana celular no se encuentra particularmente limitado.

15 Las toxinas animales contempladas en la presente invención incluyen cualesquiera sustancias venenosas producidas por un animal. Entre los ejemplos de toxinas animales se incluyen, aunque sin limitación, toxinas cardiovasculares, toxinas gastrointestinales, toxinas respiratorias, toxinas neurológicas y toxinas de insuficiencia renal/orgánica. La presente invención contempla cualesquiera toxinas animales actualmente conocidas y por descubrir en el futuro, y el tipo de toxina animal insertada en la membrana celular no se encuentra particularmente limitado. En determinadas formas de realización, la toxina animal de inserción en la membrana celular procede de un artrópodo, tal como de insectos, arácnidos y crustáceos, o de un reptil, tal como cocodrilos, rincocéfalos, *Squamata* (que incluye lagartos y serpientes) y *Testudines*.

25 En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica de la presente invención para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana célula comprende la nanopartícula, que comprende además otro u otros ingredientes activos o una carga liberable, con o sin un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las nanopartículas contenidas en dicha composición farmacéutica son biodegradables y pueden ser de cualquier forma, incluyendo, aunque sin limitación, esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo, cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto y otras formas regulares e irregulares. El diámetro de la nanopartícula puede ser de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 μm . En determinadas formas de realización, el diámetro de la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma es de aproximadamente 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1 μm , 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm , 6 μm , 7 μm , 8 μm , 9 μm y 10 μm .

35 La presente invención proporciona además un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada a una toxina de inserción en la membrana celular en un sujeto, en el que el método comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica anteriormente mencionada. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "sujeto" se refiere a un mamífero no humano, un animal o un ser humano. En determinadas formas de realización, la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula en la composición farmacéutica anteriormente mencionada se deriva de una célula de la misma especie del sujeto. En determinadas formas de realización, la membrana plasmática se deriva de un glóbulo rojo de la misma especie del sujeto y el glóbulo rojo presenta el mismo tipo sanguíneo del sujeto. En otras formas de realización, la membrana celular o la membrana plasmática se deriva de una célula del sujeto.

45 La presente invención proporciona además la administración en el sujeto que lo necesita, de otro u otros ingredientes activos, con o sin un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, junto con, o en combinación con, la composición farmacéutica anteriormente mencionada. La composición farmacéutica anteriormente mencionada de la presente invención, así como los demás ingredientes activos, pueden administrarse, solos o en combinación, mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, la vía oral, nasal, por inhalación, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, tópica o rectal. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica anteriormente mencionada de la presente invención, así como el otro ingrediente activo, se administra mediante un sistema de administración de medicamento en el sujeto que lo necesita. El tipo de vía de administración o el tipo de otro ingrediente activo utilizado en la presente memoria no se encuentran particularmente limitados.

Vacuna para una enfermedad o condición asociada a toxinas de inserción en la membrana celular

60 La presente invención proporciona una composición inmunógena específica, en la que la composición inmunógena comprende una cantidad eficaz de una nanopartícula, comprendiendo dicha nanopartícula un núcleo interno que comprende un material no celular y una superficie externa que comprende una membrana celular derivada de una célula y una toxina de inserción en la membrana celular y opcionalmente también una membrana sintética. En determinadas formas de realización, el núcleo interno soporta la superficie externa y comprende un material biocompatible o un material sintético. El material biocompatible o sintético incluye polli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina o ácido poliglutámico.

En determinadas formas de realización, la membrana celular es una membrana plasmática derivada de una célula, tal como glóbulos rojos y en la que la membrana celular o la membrana plasmática en la superficie externa de la nanopartícula conserva sustancialmente su integridad estructural para conservar sustancialmente la toxina o para inducir una respuesta inmunológica contra una toxina natural. Tal como se utiliza en la presente memoria, la integridad estructural de la toxina incluye la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la toxina tal como se encuentra unida a una célula diana. En determinadas formas de realización, la toxina se inserta en la membrana celular o membrana plasmática de la célula diana como parte del mecanismo patológico natural. La definición y tipos de "toxina" se han descrito por completo anteriormente. En determinadas formas de realización, las nanopartículas en la composición inmunógena anteriormente mencionada son biodegradables.

En determinadas formas de realización, la composición inmunógena de la presente invención comprende la nanopartícula que comprende además uno o más ingredientes activos o una carga liberable, y puede ser de cualquier forma, incluyendo, aunque sin limitación, esfera, cuadrado, rectángulo, triángulo, disco circular, forma de tipo cubo, cubo, paralelepípedo rectangular (cuboide), cono, cilindro, prisma, pirámide, cilindro circular recto y otras formas regulares e irregulares. El diámetro de la nanopartícula puede ser de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 10 μ m. En determinadas formas de realización, el diámetro de la nanopartícula en la composición inmunógena específica de neoplasma es de aproximadamente 10 nm, 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 70 nm, 80 nm, 90 nm, 100 nm, 110 nm, 120 nm, 130 nm, 140 nm, 150 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 600 nm, 700 nm, 800 nm, 900 nm, 1 μ m, 2 μ m, 3 μ m, 4 μ m, 5 μ m, 6 μ m, 7 μ m, 8 μ m, 9 μ m y 10 μ m. En determinadas formas de realización, la nanopartícula en la composición inmunógena no presenta sustancialmente los constituyentes de la célula a partir de la que se deriva la membrana celular.

La presente invención proporciona además que la composición inmunógena comprende además un adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador. La definición y tipos de adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador se han descrito por completo anteriormente. La presente invención contempla cualquier adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador adecuado y el tiempo de adyuvante inmunogénico o inmunopotenciador utilizado junto con, o en combinación con, la nanopartícula de la presente invención no se encuentra particularmente limitado.

La presente invención proporciona además una vacuna que comprende la composición inmunógena anteriormente mencionada. En la presente forma de realización, la toxina de inserción en la membrana celular se utiliza como antígeno; los anticuerpos dirigidos contra la toxina de inserción en la membrana celular pueden producirse eficientemente en un mamífero diferente de un ser humano con la composición inmunógena anteriormente mencionada. Por lo tanto, la presente invención proporciona un animal productor de anticuerpos y una célula productora de anticuerpos o gen de anticuerpo derivado del animal productor de anticuerpos. Por lo tanto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la composición inmunógena anteriormente mencionada, para la administración en un tejido diana de un sujeto, que incluye un ser humano, para inducir una respuesta inmunológica en el cuerpo vivo del mamífero.

La presente invención proporciona además un método para inducir una respuesta inmunológica sistémica o antienfermedad, resultando de esta manera en el tratamiento o la prevención de la enfermedad diana en un sujeto, en el que dicho método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de la composición inmunógena específica de neoplasma anteriormente mencionada o una vacuna de la misma, en un sujeto que lo necesita, en el que la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula en la composición inmunógena anteriormente mencionada o vacuna conserva sustancialmente su integridad estructural para inducir una respuesta inmunológica contra la célula de enfermedad diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la respuesta inmunológica puede ser una respuesta inmunológica mediada por células T y/o una respuesta inmunológica mediada por células B. La presente invención contempla cualesquiera enfermedades, trastornos o condiciones fisiológicas o patológicas, incluyendo, aunque sin limitación, una enfermedad infecciosa, una enfermedad parasitaria, un neoplasma, una enfermedad de la sangre o de órganos formadores de sangre, un trastorno que implique un mecanismo inmunológico, enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas, un trastorno mental y del comportamiento, una enfermedad del sistema nervioso, una enfermedad del ojo y anejos, una enfermedad del oído y proceso mastoideo, una enfermedad del sistema circulatorio, una enfermedad del sistema respiratorio, una enfermedad del sistema digestivo, una enfermedad de la piel y tejido subcutáneo, una enfermedad del sistema músculo-esquelético y tejido conectivo, una enfermedad del sistema genitourinario, el embarazo, el parto y el puerperio, una condición originada en el periodo perinatal, una malformación congénita, una deformación, una anomalía cromosómica, una lesión, un envenenamiento, una consecuencia de causas externas y una causa externa de morbilidad y mortalidad.

En determinadas formas de realización, la membrana celular de la superficie externa de la nanopartícula en la composición inmunógena anteriormente mencionada o vacuna se deriva de una estirpe celular o de una célula de enfermedad de la misma especie o de una especie diferente del sujeto, o del mismo sujeto o de un sujeto diferente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el "sujeto" se refiere a un mamífero no humano, un animal o un ser humano.

La presente invención proporciona además la administración en el sujeto que lo necesita, de otro u otros

ingredientes activos, con o sin un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, junto con, o en combinación con, la composición inmunógena anteriormente mencionada o vacuna. La composición inmunógena anteriormente mencionada o la vacuna de la presente invención, así como los demás ingredientes activos, pueden administrarse, solos o en combinación, mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, aunque sin limitación, la vía oral, nasal, por inhalación, parenteral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica, tópica o rectal. En determinadas formas de realización, la composición inmunógena o la vacuna de la presente invención, así como los demás ingredientes activos, se administra mediante un sistema de administración e medicamento en el sujeto que lo necesita. El tipo de vía de administración o el tipo de otro ingrediente activo utilizado en la presente memoria no se encuentran particularmente limitados.

Ejemplos

Podrán entenderse mejor algunos aspectos de las presentes enseñanzas a la luz de los ejemplos a continuación. Algunos de los Ejemplos descritos en la presente memoria también se describen en Hu et al., PNAS 108(27):10980-10985, 2011.

Ejemplo 1

Nanopartículas poliméricas camufladas con membrana de eritrocito como plataforma de administración biomimética

Mediante la extrusión de partículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) con vesículas preformadas derivadas de membrana de GR, en el contexto de la presente invención se recubrieron las partículas poliméricas sub-100 nm con las membranas bicapa de GR, que incluían tanto lípidos como las correspondientes proteínas de superficie. Este objetivo presenta como objetivo camuflar la superficie de la nanopartícula con el exterior del eritrocito para una circulación prolongada, conservando simultáneamente la aplicabilidad del núcleo polimérico. En el contexto de la presente invención se informa de la caracterización física, propiedades físicoquímicas, contenido proteico, farmacocinética y biodistribuciones de dicha plataforma biomimética de administración con nanopartículas.

El procedimiento de preparación de las nanopartículas recubiertas con membrana de RB se divide en dos partes: derivación de membranas de vesículas a partir de GR y fusión de vesículas-partículas (figura 1). La derivación de vesículas de membranas de GR siguió un método anteriormente informado con ligeras modificaciones (13). Brevemente, en primer lugar, se purificaron los GR a partir de sangre recién extraída de ratones ICR macho (6 a 8 semanas) procedentes de Charles River Laboratories (Wilmington, MA), mediante centrifugación y lavado con PBS. A continuación, los GR aislados se sometieron a ruptura de las membranas en un medio hipotónico para eliminar su contenido intracelular. A continuación, los GR vacíos se lavaron y se extrusieron a través de membranas porosas de 100 nm para crear vesículas derivadas de membranas de GR. Con el fin de sintetizar las nanopartículas poliméricas con camuflaje de membranas de GR, en primer lugar, se prepararon partículas de PLGA de aproximadamente 70 nm de diámetro a partir de 0,67 dl/g de polímero PLGA con terminación carboxilo utilizando un método de desplazamiento de solvente (14).

Las nanopartículas de PLGA resultante a continuación se fusionaron con las vesículas derivadas de membranas de GR mediante extrusión mecánica. Basándose en los cálculos a partir de la densidad de polímero PLGA, el tamaño de las nanopartículas, el contenido de lípidos de los eritrocitos y la superficie proyectada estimada de una molécula de lípido, se mezcló cada miligramo de nanopartículas de PLGA con las vesículas derivadas de 1 ml de sangre para un recubrimiento completo de las partículas. La mezcla se extruyó físicamente por un aparato con poros de 100 nm. La fuerza mecánica facilitó el cruce de las nanopartículas de PLGA sub-100 nm de las bicapas lipídicas, resultando en la fusión de vesículas-partículas. El paso repetido por el extrusor superó los problemas anteriormente informados de fusión de liposomas-partículas, tales como una distribución ancha de los tamaños de partícula, un recubrimiento incompleto de las partículas y cubiertas de lípidos inconsistentes (15). Debe indicarse además que la estructura de bicapa de las membranas de GR se conserva durante todo el procedimiento de preparación a fin de minimizar la pérdida y daños a las proteínas membranales.

Con el fin de caracterizar las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR, las partículas en primer lugar se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y después se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) (figura 2A). La imagen resultante revela una estructura de núcleo-cubierta, tal como se espera en una partícula polimérica recubierta con bicapa lipídica. El tamaño de las partículas era de 80 nm y concordaba con el diámetro hidrodinámico medido mediante dispersión dinámica de la luz (DDL): Un examen más minucioso reveló un núcleo polimérico de aproximadamente 70 nm de diámetro y una cubierta externa de lípidos de 7~8 nm de grosor. El grosor de la capa lipídica concuerda con la anchura informada de la membrana de los GR (16), lo que sugiere el éxito en la traslocación membranal con la superficie de la partícula polimérica.

Con el fin de examinar la estabilidad a largo plazo de las nanopartículas miméticas de GR resultantes, se suspendieron en 1X PBS a una concentración de 1 mg/ml y después se monitorizaron mediante DDL para el

tamaño de partícula, el índice de polidispersividad (IPD) y el potencial zeta (figura 2B). Durante un periodo de dos semanas, el tamaño de partícula se incrementó de 85 a 130 nm, el potencial zeta se redujo de -10,2 a -12,7 mV y el IDP se mantuvo relativamente estable a 0,26. Los cambios de tamaño y potencial zeta probablemente están causados por la fusión de una pequeña cantidad de vesículas en exceso en la solución de partículas. Con el fin de verificar la integridad de la estructura núcleo-cubierta de las partículas, se cargó el pigmento fluoróforo de DDL hidrófobo (excitación/emisión=644 nm/655 nm) y el pigmento rodamina-DMPE lipofílico (excitación/emisión=557 nm/571 nm) en el núcleo polimérico y las vesículas derivadas de membrana de GR, respectivamente, antes de la fusión de vesículas-partículas. Las nanopartículas de doble fluoróforo resultantes se incubaron con células HeLa durante 6 horas y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. En la figura 2C, la DiD (rojo) y la rodamina-DMPE (verde), cada una de las cuales se corresponde a un compartimiento de partículas diferente, se solapan en las mismas localizaciones. Dicha colocalización de la fluorescencia indica una estructura de núcleo-cubierta intacta de las nanopartículas después de su internalización por las células.

Tras los estudios estructurales, las partículas fueron examinadas para su contenido de proteínas. Las nanopartículas recubiertas con membrana de GR se dializaron con membranas porosas de 30 nm durante 24 horas para eliminar las proteínas no unidas y posteriormente se trataron con dodecilsulfato sódico (SDS) para solubilizar las proteínas membranales. Se prepararon en paralelo a título comparativo muestras de GR vacías y vesículas derivadas de membranas de GR. La separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) indica que la composición de las proteínas membranales se conservó en gran medida durante toda la síntesis de las partículas y puede identificarse en las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR (figura 3A). Este resultado sugiere que la traslocación de las membranas celulares bicapa también transfiere las proteínas membranales asociadas a la superficie de las nanopartículas. Debido a que el núcleo de PLGA sólido evita las entradas de las proteínas y las proteínas no unidas son eliminadas por filtración mediante diálisis, las proteínas membranales detectadas probablemente se encuentran ancladas en las membranas de bicapa lipídica que circundan las nanopartículas. Las partículas recubiertas con membrana lipídica que contienen proteínas resultantes pueden asimilarse a un modelo bien estudiado de bicapa lipídica más sencillo soportado por polímero, que se ha demostrado que conserva las funcionalidades de las proteínas asociadas a membrana (15). Sin embargo, se observaron alteraciones menores en la constitución de proteínas ya que una banda próxima a 51 kDa era notablemente más pálida. La banda pálida probablemente corresponde a proteínas membranales periféricas asociadas a proteínas citoesqueléticas espectrina, las cuales se pierden durante la extrusión mecánica de la fusión de vesículas-partículas, según se observa a partir de la banda que falta en ~200 kDa.

A continuación, en el contexto de la presente invención se determinaron la estabilidad en suero y la semivida en circulación in vivo de las nanopartículas recubiertas con membrana de GR. Poniendo los resultados en perspectiva, se utilizaron nanopartículas de PLGA desnudas de tamaño similar (~75 nm) y nanopartículas híbridas de lípido-polímero funcionalizadas con PEG (Pm: 2.000) estructuralmente análogas (~80 nm) a modo de controles negativo y positivo, respectivamente. Para el ensayo de estabilidad en suero, se utilizó un método de absorbancia anteriormente citado, para monitorizar el cambio en el tamaño de las partículas en presencia de suero de feto bovino (FBS) (17, 18). Debido a que las partículas de mayor tamaño inducen una mayor dispersión de la luz, puede observarse la agregación de partículas inestables mediante la monitorización del incremento del valor de la absorbancia. Se suspendió cada tipo de nanopartículas en FBS al 100% con una concentración final de las nanopartículas de 1 mg/ml. Todas las muestras se incubaron a 37°C y se agitaron suavemente antes de cada medición de la absorbancia. Los valores de absorbancia medidos a 560 nm sugieren que las nanopartículas recubiertas con membrana de GR presentan una estabilidad en suero equivalente a las nanopartículas híbridas de lípido-polímero funcionalizadas con PEG ya que ninguna de las muestras mostró ningún cambio observable de absorbancia durante 4 horas (figura 3B). En contraste, las nanopartículas de PLGA desnudas mostraron poca estabilidad, ya que se agregaron inmediatamente después de mezclarlas con la solución de suero.

Con el fin de estudiar el tiempo de circulación sistémica de cada tipo de nanopartículas, en el contexto de la presente invención se carga el pigmento fluorescente DDL hidrófobo en los tres tipos de nanopartícula. El pigmento mostraba una liberación mínima (<20% en 72 horas) y se ha citado ampliamente como un marcador para los estudios de circulación de nanopartículas (19, 20). Para cada tipo de partícula, se inyectaron 150 µl de nanopartículas cargadas con 3 mg/ml de DiD en un grupo de 6 ratones mediante inyección en la vena de la cola. Con el fin de evitar las respuestas inmunológicas asociadas a diferentes tipos sanguíneos, los ratones sometidos a los estudios de circulación eran de la misma cepa a partir de la cual se habían recogido los GR para preparar las nanopartículas. En diversos puntos temporales después de la inyección se recogieron 20 µl de sangre de la cuenca del ojo de los ratones para las mediciones de fluorescencia.

La figura 3C muestra que las nanopartículas recubiertas con membrana de GR presentan una retención sanguínea superior a las nanopartículas funcionalizadas con PEG. En las marcas de 24 y 48 horas, las nanopartículas recubiertas con membrana de GR mostraron una retención global de 29% y 16%, respectivamente, en comparación con el 11% y 2% mostrado por las nanopartículas recubiertas con PEG. Por otra parte, las nanopartículas de PLGA desnudas mostraron una señal despreciable en la primera sangre extraída en la marca de los 2 minutos, lo que era previsible basándose en su rápida agregación en el suero. El gráfico semilogarítmico en la ampliación de la figura 3C ilustra mejor la diferencia en los perfiles farmacocinéticos

ya que la semivida en circulación puede derivarse a partir de la pendiente de las señales semilogarítmicas. Basándose en un modelo de dos compartimientos que ha sido aplicado en estudios anteriores para ajustar los resultados de circulación de las nanopartículas (21, 22), se calculó la semivida de eliminación en 39,6 horas para las nanopartículas recubiertas con membranas de GR y en 15,8 horas para las nanopartículas recubiertas con PEG.

Alternativamente los datos de circulación en la figura 3C pueden interpretarse mediante un modelo de eliminación no lineal univariante, en el que las causas de eliminación de las nanopartículas (es decir, la disponibilidad de los sitios de eliminación y de proteínas opsoninas) se anulan continuamente, dando lugar a un enlentecimiento de la incorporación de las partículas. Simberg et al. han informado de que la inyección de partículas de "señuelo" antes de la inyección de partículas primarias puede prolongar la semivida en circulación de las partículas primarias en aproximadamente 5 veces (23). Resulta razonable esperar que la saturación del sistema RES pueda retardar una incorporación adicional de las partículas y explicar una tasa de eliminación no lineal de las mismas. Basándose en dicho modelo no lineal de eliminación, la primera semivida aparente (es decir, 50% de las partículas resultan eliminadas) es de 9,6 horas para las nanopartículas recubiertas con membrana de GR y de 6,5 horas para las nanopartículas recubiertas con PEG. Con independencia de los modelos farmacocinéticos, las nanopartículas recubiertas con membrana de GR presentan una semivida de eliminación más prolongada, lo que sugiere que el recubrimiento de membrana de GR es superior en el retardo de la eliminación in vivo al recubrimiento de escape fagocitario de PEG convencional. Este resultado confirma adicionalmente que las nanopartículas han sido modificadas con los componentes funcionales sobre las membranas de GR, las cuales contienen proteínas inmunosupresoras que inhiben la incorporación por macrófagos (24). Debido a que dichas proteínas membranales son de GR naturales recogidas de la sangre del huésped, se espera que estimulen una respuesta inmunológica despreciable después de trasladarse a la superficie de las nanopartículas poliméricas. Con la visualización de MET, los resultados de SDS-PAGE y el estudio de semivida en circulación, en el contexto de la presente invención se demuestra la transferencia de las membranas celulares y de las proteínas de superficie funcionales correspondientes para la funcionalización de las nanopartículas utilizando la técnica informada.

A continuación, en el contexto de la presente invención se determina la distribución en los tejidos in vivo de las nanopartículas recubiertas con membrana de GR con el fin de evaluar adicionalmente su potencial como vehículo de administración. Para el estudio de biodistribución, 18 ratones recibieron una inyección de 150 μ de nanopartículas cargadas con 3 mg/ml de DiD por la vena de la cola. En cada uno de los puntos temporales de 24, 48 y 72 horas después de la inyección de las partículas, 6 ratones fueron eutanizados y se recogió el hígado, riñón, bazo, cerebro, pulmón, corazón y sangre de ellos. Para la cuantificación de la fluorescencia, los órganos recogidos en diferentes puntos temporales se lavaron, se pesaron, se homogeneizaron en 1 ml de PBS y después se midieron utilizando un fluorospectrómetro. La figura 4A muestra el contenido de nanopartículas por gramo de tejido. Los dos órganos primarios del sistema RES, hígado y bazo, contenían la cantidad más elevada de nanopartículas. Sin embargo, también se observó un nivel significativo de fluorescencia en la sangre en los 3 puntos temporales.

Para una mejor comprensión de la distribución global de las partículas, se multiplicaron las señales de fluorescencia por el peso medido de los órganos correspondientes, estimando el peso de la sangre en 6% del peso corporal total. La figura 4B muestra la señal relativa en cada órgano normalizado respecto a la fluorescencia total. Tras considerar la masa de tejido, puede observarse que las nanopartículas se distribuyen principalmente en la sangre y en el hígado. Las señales fluorescentes de la sangre se correlacionan bien con los datos del estudio de semivida en circulación, con una retención de 21%, 15% y 11% de las nanopartículas en las marcas de 24, 48 y 72 h, respectivamente. Además, a medida que se reduce la fluorescencia de la sangre, se observó un incremento correspondiente de señal en el hígado, que indica que la fuente de la fluorescencia en la sangre fue eventualmente incorporada por el sistema RES. Dicho resultado valida que la fluorescencia de la sangre observada procedía de las nanopartículas de largo periodo en circulación y no de la fuga del pigmento, que sería secretado por los riñones y resultaría en una reducción de la intensidad de señal del hígado. Cabe indicar que las nanopartículas poliméricas recubiertas con membrana de GR presentan un tiempo de circulación significativamente más prolongado que los liposomas derivados de GR anteriormente informados, los cuales son eliminados de la circulación sanguínea en menos de 30 minutos (13). Este tiempo de circulación prolongado por las nanopartículas recubiertas con membrana de GR puede atribuirse a una rigidez estructural más elevada, mejor estabilidad de las partículas y un encapsulado de carga/pigmento más fiable. En comparación con otros datos publicados sobre las circulaciones de nanopartículas en modelos de ratón (14, 25, 26), la mayoría de los cuales muestra una retención en sangre despreciable tras 24 horas, las nanopartículas recubiertas con membrana de GR mostraban un tiempo de residencia in vivo superior y presentan un potencial enorme de aplicación biomédica como plataforma robusta de administración.

Las nanopartículas recubiertas con membrana de eritrocito informadas en la presente memoria son estructuralmente análogas a las nanopartículas híbridas de lípido-polímero citadas comúnmente, que están rápidamente emergiendo como plataforma multifuncional prometedora de administración de fármacos que contiene las características deseables de nanopartículas tanto de liposomas como poliméricas (27, 28). Las nanopartículas híbridas de lípido-polímero han mostrado un perfil de liberación de fármaco más sostenido que las

nanopartículas poliméricas de tamaño similar debido a la barrera a la difusión proporcionada por el recubrimiento de monocapa lipídica. La cinética de liberación de fármaco a partir de las nanopartículas recubiertas con membrana de GR se espera que sea todavía más gradual debido a que la membrana de GR proporciona una barrera lipídica más densa y bicapa contra la difusión del fármaco. El enfoque de recubrimiento con membrana

en el presente estudio también puede extenderse a otras nanoestructuras ya que la versatilidad del recubrimiento con lípido ha llegado a las nanopartículas de sílice y puntos cuánticos (29-31). Puede conseguirse una funcionalización adicional de las partículas mediante la inserción de lípidos modificados, derivados de lípidos o proteínas transmembranales a las membranas lipídicas antes de la preparación de las nanoestructuras recubiertas con membrana de GR.

Con respecto a la traducción de dichas nanopartículas recubiertas con membrana de GR en vehículo de administración de fármaco clínico, quedan por delante muchos retos y oportunidades. Al contrario que en estudios animales, los eritrocitos humanos contienen numerosos antígenos de superficie que pueden clasificarse en muchos grupos sanguíneos diferentes. Con el fin de optimizar las partículas para una administración de fármaco de circulación prolongada, las partículas necesitan cruzarse con la sangre de los pacientes, como es el caso de la transfusión de sangre. Para aplicaciones más versátiles a poblaciones amplias de pacientes, las partículas pueden empobrecerse selectivamente en dichas proteínas inmunógenas durante las etapas de síntesis. Alternativamente, dicha plataforma biomimética de administración podría ser un método elegante para la medicina personalizada, de manera que el nanoportador de administración de fármaco se adapta a pacientes individuales con poco riesgo de inmunogenicidad mediante la utilización de sus propias membranas de GR como recubrimiento de las partículas.

En conclusión, en el contexto de la presente invención se demuestra la síntesis de una nanopartícula polimérica camuflada con membrana de eritrocitos para la administración de carga de circulación prolongada. La técnica adoptada proporciona nanopartículas miméticas de células mediante un enfoque de arriba a abajo que evita los procedimientos laboriosos de identificación, purificación y conjugación de proteínas. El método propuesto proporciona además un medio bicapa para el anclaje de proteínas transmembranales y evita las modificaciones químicas que podrían comprometer la integridad y funcionalidades de las proteínas diana. En el contexto de la presente invención se demuestra que la capa lipídica puede derivarse directamente de células vivas. La traslocación de membranas celulares naturales y sus funcionalidades asociadas a la superficie de la partícula representa un enfoque de arriba a abajo único y robusto en la funcionalización de las nanopartículas.

Materiales y métodos:

Derivación de fantasmas de glóbulos rojos (GR). Los fantasmas de GR sin contenido citoplasmático se prepararon siguiendo protocolos anteriormente publicados, con modificaciones (32). En primer lugar, se extrajo sangre completa de ratones ICR macho (6 a 8 semanas) obtenidos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) mediante punción cardíaca utilizando una jeringa que contenía una gota de solución de heparina (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). A continuación, se centrifugó la sangre completa a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y a continuación se extrajo cuidadosamente el suero y la capa leucocitaria. Los GR empaquetados resultantes se lavaron en 1X PBS helado antes del tratamiento con medio hipotónico para la hemólisis. Los GR lavados se suspendieron en 0,25X PBS en un baño de hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó la hemoglobina, mientras que se recogió el pellet rosa. Los fantasmas de GR resultantes se verificaron utilizando microscopía de contraste de fases, que reveló una estructura celular intacta con un contenido celular alterado (figura 5).

Preparación de vesículas derivadas de membranas de GR. Los fantasmas de GR recogidos se sonicaron en un vial de vidrio tapado durante 5 minutos utilizando un sonicador de baño FS30D (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a una frecuencia de 42 kHz y una potencia de 100 W. Las vesículas resultantes seguidamente se extruyeron en serie a través de membranas porosas de policarbonato de 400 nm y después de 100 nm utilizando un miniextrusor Avanti (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). Con el fin de visualizar el compartimiento liposómico en las vesículas derivadas de membrana de GR, se mezcló 1 ml de sangre completa con 20 µg de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisamina rodamina B-sulfonilo) (sal amónica) (DMPE-RhB) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) durante el procedimiento de preparación de las vesículas. Se midió el tamaño de las vesículas derivadas de membrana de GR mediante dispersión dinámica de la luz (DDL) tras cada etapa de preparación (figura 6).

Preparación de nanopartículas de PLGA. Se prepararon núcleos poliméricos de PLGA utilizando 0,67 dl/g de poli(DL-láctico-co-glicólido) 50:50 con terminación carboxi (polímeros absorbibles LACTEL, Cupertino, CA) en un procedimiento de desplazamiento de solvente. En primer lugar, se disolvió el polímero PLGA en acetona a una concentración de 1 mg/ml. Para preparar 1 mg de nanopartículas de PLGA, se añadió gota a gota 1 ml de la solución a 3 ml de agua. A continuación, la mezcla se agitó al aire libre durante 2 horas. La solución de nanopartículas resultante se filtró con filtros centrifugos Amicon Ultra-4 de 10k de MWCO (Millipore, Billerica, MA) y se resuspendieron en 1 ml de PBS (1X, pH=7,4). Con fines de obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia y rastreo in vivo de partículas, se añadieron 2 µg de pigmento sal 4-clorobencenosulfonato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiD) (Invitrogen, Carlsbad, CA) a la solución de PLGA-acetona

antes de la síntesis de nanopartículas de PLGA. La liberación del pigmento DiD a partir de las nanopartículas de PLGA se examinó utilizando un método de diálisis en el que se cargaron 100 µl de las soluciones de nanopartículas preparadas en un microtubo de diálisis MINI Slide-A-Lyzer con un corte de peso molecular de 3,5 kDa (Pierce, Rockford, IL). Las nanopartículas se dializaron en tampón PBS a 37°C. La solución de PBS se cambió cada 12 horas durante el procedimiento de diálisis. En cada punto temporal predeterminado, se recogieron por separado soluciones de nanopartículas procedentes de tres unidades de minidiálisis para la cuantificación del pigmento utilizando un lector de multiplacas Infinite M200 (TeCan, Suiza) (figura 7). Como partícula de control, se prepararon nanopartículas híbridas de lípido-PLGA recubiertas con PEG mediante un método de nanoprecipitación.

Cultivo de tejidos y endocitosis de nanopartículas. La estirpe celular de carcinoma epitelial humano (HeLa) se mantuvo en RPMI (Gibco BRL, Grand Island, NY) complementado con albúmina de feto bovino al 10%, penicilina/estreptomina (Gibco-BRL), L-glutamina (Gibco-BRL), aminoácidos no esenciales MEM (Gibco-BRL), bicarbonato sódico (Cellgro, Herndon, VA) y piruvato sódico (Gibco-BRL). Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ y se sembraron en portaobjetos con cámara (Cab-Tek II, ocho pocillos, Nunc, Rochester, NY) con los medios anteriormente mencionados. El día del experimento, las células se lavaron con PBS precalentado y se incubaron con medio RPMI precalentado durante 30 minutos antes de la adición de 100 µg de DMPE-RhB y nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR marcadas con DiD. Las nanopartículas se incubaron con células durante 4 horas a 37°C. A continuación, las células se lavaron con PBS 3 veces, se fijaron con fijador de tejidos (Millipore, Bellerica, MA) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, tinción nuclear), se montaron en reactivo ProLong Gold antifade (Invitrogen) y se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia de barrido con desconvolución (DeltaVision System, Applied Precision, Issaquah, WA). Se capturaron imágenes digitales de fluorescencia azul, verde y roja bajo filtros de DAPI, FITC y CY5, respectivamente, utilizando un objetivo de inmersión de aceite de 100X. Se superpusieron las imágenes y se desconvolucionaron utilizando el software softWoRx.

Fusión de vesículas derivadas de membrana de GR con nanopartículas de PLGA. Con el fin de fusionar las vesículas derivadas de membrana de GR con las nanopartículas de PLGA, se mezcló 1 mg de nanopartículas de PLGA con vesículas derivadas de membrana de GR preparadas a partir de 1 ml de sangre completa y después se extruyeron 7 veces a través de una membrana porosa de policarbonato de 100 nm utilizando un miniextrusor Avanti. La proporción de mezcla se estimó basándose en el volumen de membrana de GR y el volumen total de membrana requerido para recubrir por completo 1 mg de nanopartículas de PLGA. Entre los parámetros utilizados para la estimación se incluyen la superficie media de GR de ratón (75 µm²), el grosor de membrana de las GR (7 nm), la densidad de nanopartículas de PLGA 50:50 (1,34 g/cm³) (35), la concentración de glóbulos rojos en sangre de ratón (7.000 millones por ml) (36) y el tamaño medio de partícula según medición por DDL antes y después del recubrimiento con membrana de GR (figura 8). Se utilizó un exceso de sangre para compensar para la pérdida de membranas durante la derivación de fantasmas de GR y la extrusión. Las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR resultantes se dializaron frente a membranas porosas de 30 nm (Avanti Polar Lipids) durante 24 horas y se concentraron mediante purga con nitrógeno. El tamaño de partícula y la polidispersividad se mantuvieron idénticos tras la diálisis y concentración.

Caracterización de las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR. Se midió el tamaño de las nanopartículas (diámetro, nm), la polidispersividad y la carga de superficie (potencial zeta, mV) mediante DDM utilizando un Nano-ZS modelo ZEN3600 (Malvern, Reino Unido). Se suspendieron las nanopartículas (~500 µg) en 1X PBS (~1 ml) y se llevaron a cabo mediciones por triplicado a temperatura ambiente durante 2 semanas. Se llevaron a cabo ensayos de estabilidad en suero mediante la suspensión de las nanopartículas en suero de feto bovino al 100% (FBS) (Hyclone, Logan, UT) con una concentración final de nanopartículas de 1 mg/ml. En primer lugar, las partículas se concentraron a 2 mg/ml y a continuación se añadió FBS concentrado 2X a volumen igual. Se llevaron a cabo mediciones de la absorbancia utilizando un lector de multiplacas Infinite M200. Las muestras se incubaron a 37°C bajo agitación suave antes de cada medición. Se midió la absorbancia a 560 nm aproximadamente cada 30 minutos durante un periodo de 4 horas.

Obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión. Se examinó la estructura de las nanopartículas recubiertas con membrana de GR utilizando un microscopio electrónico de transmisión. Se depositó una gota de la solución de nanopartículas a una concentración de 4 µg/ml sobre una rejilla recubierta de carbón sobre la que previamente se había realizado una descarga luminiscente. Cinco minutos después de depositar la muestra, se enjuagó la rejilla con 10 gotas de agua destilada. Se añadió a la rejilla una gota de tinción de acetato de uranilo al 1%. La rejilla seguidamente se secó y se visualizó utilizando un microscopio FEI 200KV Sphera.

Caracterización de proteínas mediante SDS-PAGE. Los fantasmas de GR, las vesículas derivadas de membrana de GR y las nanopartículas de PLGA recubiertas con membrana de GR dializadas se prepararon en tampón para muestras SDS (Invitrogen). A continuación, se analizaron las muestras en un minigel de 10 pocillos NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris en un tampón de migración de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) utilizando un sistema de electroforesis NovexSureLockXcell (Invitrogen). Las muestras se analizaron a 150 V durante 1 hora y el gel de poliacrilamida resultante se tiñó en SimplyBlue (Invitrogen) durante la noche para la visualización.

Farmacocinética y estudios de biodistribución. Todos los procedimientos con animales cumplieron las directrices institucionales del comité de cuidado y uso animal de la Universidad de California San Diego. Los experimentos se llevaron a cabo con ratones ICR macho (6 a 8 semanas) de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Con el fin de evaluar la semivida en circulación de las nanopartículas recubiertas con membrana de GR, se inyectaron 150 µl de nanopartículas cargadas con DiD en la vena de la cola de los ratones. Se recogieron 20 µl de sangre 1, 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. La misma dosis de nanopartículas híbridas de lípido-PLGA recubiertas con PEG que contenían DiD y nanopartículas de PLGA desnudas también se sometieron a ensayo en paralelo a modo de controles. Cada grupo de partículas contenía 6 ratones. Las muestras de sangre recogidas se diluyeron con 30 µl de PBS en una placa de 96 pocillos antes de la medición de la fluorescencia. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para ajustarse a un modelo de dos compartimientos.

Para el estudio de biodistribución de las nanopartículas en diversos tejidos, 18 ratones recibieron una inyección de 150 µl de nanopartículas cargadas con 3 mg/ml de DiD por la vena de la cola. En cada uno de los puntos temporales de 24, 48 y 72 horas después de la inyección de partículas, se seleccionaron aleatoriamente 6 ratones y se eutanizaron. Se recogió su hígado, riñones, bazo, cerebro, pulmones, corazón y sangre. Los órganos recogidos se pesaron cuidadosamente y después se homogeneizaron en 1 ml de PBS. Se estimó el peso total de sangre en 6% del peso corporal del ratón. Se determinó la intensidad de la fluorescencia de cada muestra utilizando un lector de multiplacas Infinite M200.

Referencias

1. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 53:283-318.
2. Davis ME, Chen ZG, Shin DM (2008) Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 7:771-782.
3. Peer D, et al. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2:751-760.
4. Yoo JW, Chambers E, Mitragotri S (2010) Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. *Curr Pharm Des* 16:2298-2307.
5. Geng Y, et al. (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* 2:249-255.
6. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC (2008) Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm* 5:505-515.
7. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed* 49:6288-6308.
8. Jiang SY, Cao ZQ (2010) Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv Mater* 22:920-932.
9. Yang W, Zhang L, Wang S, White AD, Jiang S (2009) Functionalizable and ultra stable nanoparticles coated with zwitterionic poly(carboxybetaine) in undiluted blood serum. *Biomaterials* 30:5617-5621.
10. Doshi N, Zahr AS, Bhaskar S, Lahann J, Mitragotri S (2009) Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21495-21499.
11. Tsai RK, Rodriguez PL, Discher DE (2010) Self inhibition of phagocytosis: the affinity of 'marker of self CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels. *Blood Cells Mol Dis* 45:67-74.
12. Merkel TJ, et al. (2011) Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:586-591.
13. Desilets J, Lejeune A, Mercer J, Gicquaud C (2001) Nanoerythrocytes, a new derivative of erythrocyte ghost: IV. Fate of reinjected nanoerythrocytes. *Anticancer Res* 21:1741-1747.
14. Cheng J, et al. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28:869-876.

15. Tanaka M, Sackmann E (2005) Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature* 437:656-663.
- 5 16. Hochmuth RM, Evans CA, Wiles HC, McCown JT (1983) Mechanical measurement of red cell membrane thickness. *Science* 220:101-102.
17. Fang RH, Aryal S, Hu CM, Zhang L (2010) Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir* 26:16958-16962.
- 10 18. Popielarski SR, Pun SH, Davis ME (2005) A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 1. Synthesis and characterization. *Bioconjug Chem* 16:1063-1070.
- 15 19. Goutayer M, et al. (2010) Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur J Pharm Biopharm* 75:137-147.
- 20 20. Xiao K, et al. (2009) A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. *Biomaterials* 30:6006-6016.
21. Gratton SE, et al. (2007) Nanofabricated particles for engineered drug therapies: a preliminary biodistribution study of PRINT nanoparticles. *J Control Release* 121:10-18.
- 25 22. Peracchia MT, et al. (1999) Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 60:121-128.
23. Simberg D, et al. (2007) Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:932-936.
- 30 24. Oldenborg PA, et al. (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 288:2051-2054.
25. Gu F, et al. (2008) Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2586-2591.
- 35 26. Avgoustakis K, et al. (2003) Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 259:115-127.
27. Zhang L. (2010) Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications. *Nano LIFE* 1:163-173.
- 40 28. Sengupta S, et al. (2005) Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* 436:568-572.
29. Valencia PM, et al. (2010) Single-step assembly of homogenous lipid-polymeric and lipid-quantum dot nanoparticles enabled by microfluidic rapid mixing. *ACS Nano* 4:1671-1679.
- 45 30. Liu J, Stace-Naughton A, Jiang X, Brinker CJ (2009) Porous nanoparticle supported lipid bilayers (protocells) as delivery vehicles. *J Am Chem Soc* 131:1354-1355.
31. van Schooneveld MM, et al. (2010) Imaging and quantifying the morphology of an organic-inorganic nanoparticle at the sub-nanometre level. *Nat Nanotechnol* 5:538-544.
- 50 32. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100: 119-130.
- 55 33. Zhang L, et al. (2008) Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform. *ACS Nano* 2:1696-1702.
34. Waugh RE, Sarelius IH (1996) Effects of lost surface area on red blood cells and red blood cell survival in mice. *Am J Physiol* 271:C1847-1852.
- 60 35. Arnold MM, Gorman EM, Schieber LJ, Munson EJ, Berkland C (2007) NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. *J Control Release* 121:100-109.
- 65 36. Jacobs RL, Alling DW, Cantrell WF (1963) An evaluation of antimalarial combinations against plasmodium berghei in the mouse. *J Parasitol* 49:920-925.

37. Lund, R.; Leth-Larsen, R.; Jensen, O. N.; Ditzel, H. J., Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. *J Proteome Res* 2009, 8 (6), 3078-3090.
- 5 38. Graham, J. M., Isolation of membranes from tissue culture cells. *Methods Mol Biol* 1993, 19, 97-108,
39. Vayro, S.; Kemp, R.; Beechey, R. B.; Shirazi-Beechey, S., Preparation and characterization of basolateral plasma-membrane vesicles from sheep parotid glands. Mechanisms of phosphate and D-glucose transport. *Biochem J* 1991, 279 (Pt 3), 843-848.
- 10 40. Navas, P.; Nowack, D. D.; Morre, D. J., Isolation of purified plasma membranes from cultured cells and hepatomas by two-phase partition and preparative free-flow electrophoresis. *Cancer Res* 1989, 49 (8), 2147-2156.
- 15 41. Henon, M.; Bedouin, A.; Polonovski, J., [Isolation, identification and characterization of a plasma membrane preparation of guinea pig macrophages]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1977, 285 (1), 121-122.
- 20 42. Boone, C. W.; Ford, L. E.; Bond, H. E.; Stuart, D. C.; Lorenz, D., Isolation of plasma membrane fragments from HeLa cells. *J Cell Biol* 1969, 41 (2), 378-392.

Ejemplo 2

Nanopartículas poliméricas cubiertas con membrana de eritrocito para la carga y liberación controladas de fármaco

Las nanopartículas poliméricas (NP) cubiertas con membrana de glóbulo rojo (GRm) confieren las ventajas combinadas de una vida en circulación prolongada y una retención y liberación controladas del fármaco. Para desarrollar esta plataforma de NP miméticas de células para aplicaciones avanzadas de administración de fármaco, en la presente memoria el inventor llevó a cabo estudios para obtener una mejor comprensión sobre su carga de fármaco, cinética de liberación de fármaco y eficacia celular. Específicamente, para estudiar la liberación de fármaco a partir de las NP con cubierta de GRm, el inventor comparó dos estrategias de carga de doxorubicina (DOX), un fármaco anticáncer modelo, en NP con cubierta de GRm: encapsulado físico y conjugación química. Se examinó la eficacia in vitro mediante la utilización de la estirpe celular de leucemia mieloide aguda (LMA) Kasumi-1.

En el contexto de la presente invención se descubre que la estrategia de conjugación química resultaba en un perfil de liberación de fármaco más sostenida. Además, mediante la formulación de NP PEGiladas de los mismos núcleos poliméricos que las NP con cubierta de GRm pero diferentes recubrimientos de superficie, en el contexto de la presente invención se demuestra que la cubierta de GRm proporcionaba una barrera de retardo de la difusión hacia el exterior de las moléculas de fármaco encapsuladas. Estudio de eficacia de la estirpe celular de LMA Kasumi-1, las NP con cubierta de GRm mostraron una toxicidad más elevada en comparación con DOX libre. Estos resultados indican que las NP con cubierta de GRm son una plataforma de administración valiosa para la administración controlada y sostenida de agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como los cánceres sanguíneos.

Introducción

En las últimas décadas, los avances en la ingeniería de materiales a la escala nanométrica han resultado en una multitud de sistemas de administración de fármaco basados en nanopartículas (NP) de aplicación clínica [1, 2]. Las ventajas únicas de estas nanomedicinas, en particular su mejora respecto a los agentes terapéuticos existentes respecto a la alteración de su farmacocinética y biodistribución, descansan en su capacidad de circular en el torrente sanguíneo durante un periodo de tiempo prolongado [3, 4]. En consecuencia, un interés de investigación considerable se ha centrado en la búsqueda de nuevos materiales, tanto naturales como de síntesis, que permitan a las NP evitar la incorporación por macrófagos y la eliminación sistémica [5, 6]. Simultáneamente, se han explorado ampliamente estrategias destinadas a extender el tiempo de residencia de las partículas in vivo mediante la modificación de las propiedades físicoquímicas de las NP, incluyendo el tamaño, la forma, la deformidad y las características de superficie [7, 8].

Desde esta perspectiva, el inventor ha desarrollado recientemente un sistema de administración de fármaco de NP con cubierta de membrana de glóbulo rojo (GRm) con las ventajas combinadas de un tiempo de circulación prolongado a partir de los G y una retención y liberación controladas del fármaco a partir de las partículas poliméricas [9]. El enfoque de arriba a abajo, basado en la extrusión de partículas poliméricas mezcladas con vesículas derivadas de GRm preformadas, transloca la GRm entera con proteínas membranales conservadas a la superficie de los núcleos poliméricos sub-100 nm, resultando en NP cubiertas con el exterior de los eritrocitos para una circulación sistémica prolongada. Esta estrategia de mimetización celular proporciona un medio de

membrana celular que circunda los núcleos poliméricos para el anclaje de las proteínas transmembranales, evitando por lo tanto modificaciones químicas en las mimetizaciones de superficie convencionales de las NP que podrían comprometer la integridad y funcionalidad de las proteínas.

5 En los esfuerzos continuos para desarrollar adicionalmente esta plataforma de NP de mimetización celular para aplicaciones avanzadas de administración de fármaco, en la presente memoria se informa de estrategias de formulación de carga de fármacos quimioterapéuticos de molécula pequeña, tales como la doxorubicina (DOX), un fármaco anticáncer modelo, en las NP y el estudio de la cinética de liberación del fármaco con énfasis en el papel desempeñado por la cubierta de GRm en la retención del fármaco. Específicamente, para cargar las moléculas de DOX en el núcleo de las NP, en el contexto de la presente invención se han explorado dos estrategias diferentes: encapsular físicamente las moléculas de fármaco en la matriz de polímero y conjugar químicamente las moléculas de fármaco con los esqueletos poliméricos, y han demostrado que resultan en rendimientos de carga de fármaco y cinéticas de liberación diferentes. En el contexto de la presente invención se ha formulado además NP con los mismos núcleos de polímero que las NP con cubierta de GRm pero recubiertas con poli(etilenglicol) (PEG, NP PEGiladas) en lugar de con GRm. La comparación de los perfiles de liberación de fármaco de los dos sistemas de administración demuestra que la cubierta de GRm proporciona una barrera que retarda la difusión hacia el exterior de las moléculas de fármaco encapsuladas y, por lo tanto, podría explotarse potencialmente para controlar mejor la liberación del fármaco. Además, al examinar el potencial terapéutico de las NP con cubierta de GRm, en el contexto de la presente invención se ha seleccionado la estirpe celular de leucemia mieloide aguda (LMA) Kasumi-1 y demuestran que las NP con cubierta de GRm cargadas con DOX muestran una toxicidad más elevada que la misma cantidad de DOX libre.

Materiales y métodos:

25 2.1. Derivación de fantasmas de GR

Los fantasmas de GR sin contenido citoplasmático se prepararon siguiendo protocolos anteriormente publicados, con modificaciones [9, 10]. Brevemente, sangre completa, extraída de ratones ICR macho (6 a 8 semanas, Charles River Laboratories) mediante punción cardíaca con una jeringa que contenía una gota de solución de heparina (Cole-Parmer) se centrifugó (800 x g durante 5 min a 4°C) para eliminar el suero y la capa leucocitaria. Los GR empaquetados se lavaron en 1X PBS helado, se trataron con medio hipotónico para la hemólisis y después se suspendieron en 0,25 x PB en un baño de hielo durante 20 min. Se eliminó la hemoglobina mediante centrifugación de la suspensión a 800 x g durante 5 min. Se recogieron los fantasmas de GR en forma de un pellet rosa.

35 2.2. Preparación de vesículas derivadas de GRm

Los fantasmas de GR recogidos se conicaron en un vial de vidrio tapado durante 5 min utilizando un baño sonicador FS30D (Fisher Scientific) a una frecuencia de 42 kHz y una potencia de 100 W. Las vesículas resultantes seguidamente se extruyeron repetidamente a través de membranas porosas de policarbonato de 400 nm y después de 200 nm mediante la utilización de un miniextrusor Avanti (Avanti Polar Lipids). Tras cada extrusión, se monitorizó el tamaño de las vesículas derivadas de GR mediante dispersión dinámica de la luz (DDL, Nano-ZS modelo ZEN3600).

45 2.3. Polimerización por apertura del anillo de L-láctido

Se sintetizó DOX-poli(ácido láctido) (PLA) basándose en un protocolo publicado [11, 12]. Brevemente, la polimerización por apertura del anillo del L-láctido (Sigma-Aldrich, USA) fue catalizada por un complejo de alcoxi (BDI)ZnN(SiMe₃)₂ en una caja de manipulación con guantes llena de argón a temperatura ambiente. Se mezcló (BDI)ZnN(SiMe₃)₂ (6,4 mg, 0,01 mmoles) y DOX (Jinan Wedo Co., Ltd., Jinan, China) (5,4 mg, 0,01 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (THF, 0,5 mL), en donde se añadió gota a gota L-láctido (101 mg, 0,7 mmoles) disuelto en 2 ml de THF anhidro. Tras consumir por completo el L-láctido tal como indicaba el RMN ¹H (espectrómetro Varian Mercury 400 MHz), el producto en bruto se precipitó en éter dietílico frío y se purificó mediante múltiples ciclos de disolución-precipitación. Se confirmó la conjugación mediante RMN ¹H y los conjugados presentaban un peso molecular de ~10.000 g/mol determinados mediante cromatografía de permeación en gel (GPC, Viscotek, USA).

2.4. Preparación del núcleo de las NP y carga de DOX

60 En primer lugar, se disolvió conjugado de DOX-PLA en acetonitrilo para formar una solución 1 mg/ml y 1 ml de dicha solución se añadió gota a gota a 3 ml de agua. A continuación, la mezcla se agitó al aire libre durante 2 horas, dejando que se evaporase el acetonitrilo. La solución resultante de núcleos de NP se filtró mediante filtros centrífugos Amicon Ultra-4 (Millipore, corte de 10 kDa) y después se resuspendieron en 1 ml de agua destilada. Para encapsular físicamente la DOX, en primer lugar se disolvió 1 mg de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA, 0,67 dl/g, con terminación carboxi, polímeros absorbibles LACTEL) en 1 ml de acetonitrilo, seguido de la adición de DOX predisuelta en 25 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Se siguieron procedimientos similares a los descritos

anteriormente para generar suspensiones que contenían núcleos de NP.

2.5. Fusión de vesículas derivadas de GRm con núcleos de NP

5 Con el fin de fusionar las vesículas derivadas de GRm con los núcleos de NP anteriormente indicados, en primer lugar se mezclaron suspensiones que contenían 1 mg de núcleos de NP con vesículas derivadas de GRm preparadas a partir de 1 ml de sangre completa. A continuación, la mezcla se extruyó 11 veces a través de una membrana porosa de policarbonato de 100 nm con un miniextrusor Avanti. Para recubrir por completo 1 mg de núcleos de NP, se utilizó un exceso de sangre para compensar para la pérdida de membranas durante la derivación de fantasmas de GR y la extrusión [9].
10

2.6. Preparación de NP PEGiladas

15 El conjugado de DOX-PLA y PLA-PEG-COOH (10 kDa, IPD=1,12) [13] en una proporción en peso de 1:1 en primer lugar se disolvió en acetonitrilo a una concentración de 1 mg/ml, seguido de los mismos procedimientos descritos anteriormente para producir suspensiones de NP. Para encapsular físicamente la DOX en las NP PEGiladas, en primer lugar se disolvió 1 mg de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA, 0,67 dl/g, con terminación carboxi, polímeros absorbibles LACTEL) en 1 ml de acetonitrilo, seguido de la adición de 100 µg de DOX predisuetos en 25 µl de DMSO. Se utilizaron los mismos procedimientos descritos anteriormente para producir suspensiones de NP.
20

2.7. Estudios de estabilidad de las NPL

25 Se evaluó la estabilidad de las NP en PBS mediante monitorización del tamaño de partícula utilizando la DDL. Específicamente, se suspendieron 500 µg de NP en 1 ml de 1 x PBS y se midieron los tamaños por triplicado a temperatura ambiente cada 24 horas durante un periodo de una semana. Entre mediciones, se incubaron las muestras a 37°C bajo agitación suave. Se evaluó la estabilidad en suero de las NP mediante monitorización de la absorbancia de UV a la longitud de onda de 560 nm. Específicamente, en primer lugar se concentraron las NP a 2 mg/ml en PBS, seguido de la adición de 2x suero de feto bovino (FBS, Hyclone) de igual volumen. Se midió la absorbancia mediante la utilización de un lector de multiplacas Infinite M200 a 37°C aproximadamente cada 1 minuto durante un periodo de 2 horas.
30

2.8. Medición del rendimiento y liberaciones de la carga de fármaco

35 Se determinó la concentración de DOX en una solución mediante la medición de las intensidades de fluorescencia a 580 nm con una longitud de onda de excitación de 480 nm. Con el fin de determinar el rendimiento de carga de DOX de las NP, se llevó a cabo la medición de fluorescencia anteriormente indicada tras incubación 100 µl de solución de NP con 100 µl de HCl 0,1 M en acetonitrilo durante 24 horas. Para representar gráficamente los perfiles de liberación de DOX, se cargaron 200 µl de solución de NP (1 mg/ml) en un microtubo de diálisis Slide-A-Lyzer MINI (Pierce, Rockford, IL; corte de peso molecular=3,5 kDa) y después se dializaron frente a 2 l de PBS (pH=7,4) a 37°C. Se cambió el tampón de PBS cada 12 horas durante todo el procedimiento de diálisis. En cada punto temporal predeterminado, se recolectaron las soluciones de NP de las tres unidades de mini diálisis y se midió la concentración de DOX.
40

2.9. Ensayo de viabilidad celular

45 Se evaluó la citotoxicidad de la DOX libre de y de las NP cargadas con DOX frente a la estirpe celular Kasumi-1 establecida a partir de la sangre periférica de un paciente de leucemia mieloide aguda (LMA) utilizando el ensayo de MTT (Promega Corporation, Madison, WI, USA). En primer lugar, las células se sembraron ($\sim 5 \times 10^3$ en cada pocillo) en placas de 96 pocillos y después se incubaron durante 24 horas. Tras la adición de DOX libre o NP cargadas de DOX, las células se incubaron durante 72 horas adicionales. A continuación, se determinó la viabilidad celular mediante la utilización del ensayo de MTT siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.
50

Resultados y comentario

3.1. Preparación de NP con cubierta de GRm

60 El procedimiento de preparación de NP con cubierta de GRm se basó en el protocolo publicado anteriormente y que se ilustra esquemáticamente en la figura 9 [9]. Brevemente, los GR purificados en primer lugar se sometieron a ruptura de las membranas en un medio hipotónico para eliminar su contenido intracelular. A continuación, los GR vacíos (~ 2 µm de diámetro) se lavaron y se extruyeron a través de membranas porosas de 100-nm para crear vesículas derivadas de membranas de GR (~ 200 nm de diámetro). Simultáneamente, se prepararon núcleos poliméricos (~ 70 nm de diámetro), tales como los preparados a partir de PLA o PLGA, mediante la utilización de un método de desplazamiento de solvente. Los núcleos poliméricos resultantes seguidamente se mezclaron con vesículas derivadas de membranas de GR y la mezcla se extruyó físicamente a través de poros
65

de 100 nm, en donde los dos componentes se fusionaron bajo la fuerza mecánica y formaron NP con cubierta de GRm (~90 nm de diámetro).

3.2. Carga de doxorubicina (DOX) en NP con cubierta de GRm

En el presente estudio, se examinaron dos métodos diferentes de carga de DOX como fármaco modelo en las NP con cubierta de GRm: encapsulado físico y conjugación química. El encapsulado físico se consigue mezclando en primer lugar la DOX y los polímeros en acetonitrilo, seguido de la precipitación en agua. En este caso, el rendimiento de carga de fármaco puede variarse mediante diferentes parámetros de formulación. Por ejemplo, al variar la proporción inicial en peso de DOX a PLGA de 5% a 20%, el rendimiento de carga se incrementó de 0,9% a 1,8% (ver la figura 10).

Alternativamente, puede cargarse moléculas de DOX en núcleos de NP mediante la conjugación covalente de moléculas de fármaco con esqueletos de polímero. Intuitivamente, las moléculas de DOX pueden conjugarse directamente con cadenas de PLA con terminación carboxilo mediante grupos hidroxilo; sin embargo, este enfoque provoca heterogeneidades para los conjugados de polímero-fármaco, debido en gran parte a la polidispersividad de las cadenas de polímero, la falta de control sobre la conjugación regio- y quimio-selectiva de las moléculas de DOX que contienen múltiples grupos hidroxilo y la falta de control sobre la eficiencia de la conjugación. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención se adopta un enfoque alternativo, en el que el grupo hidroxilo de la DOX, con la presencia del monómero L-láctido y (BDI)ZnN(SiMe₃)₂ como catalizador, se utilizaron para iniciar la polimerización por apertura del anillo (ROP), conduciendo a la formación de conjugados de PLA-DOX [11, 12]. En este enfoque, debido a que la reacción de polimerización es iniciada por la molécula de fármaco misma, puede conseguirse una eficiencia de conjugación de prácticamente 100%. Además, el catalizador de amido metálico (BDI)ZnN(SiMe₃)₂ preferentemente permite la propagación de PLA en la posición C₁₄-OH de DOX en lugar de sus posiciones más impedidas estéricamente C₄'- y C₉-OH. Tras terminar la reacción, los productos se purificaron mediante la utilización de ciclos repetidos de disolución-precipitación y después se caracterizaron mediante la utilización de espectroscopía de RMN-¹H. Se observaron picos de resonancia de protones correspondientes a tanto las moléculas de DOX como a los esqueletos de PLA, incluyendo los protones aromáticos de DOX en $\delta = 7,5$ y $8,0$ ppm, protones del grupo -CH₃ de PLA en $\delta = 1,5$ ppm y el grupo -CH de PLA en $\delta = 5,2$ ppm, confirmando por lo tanto la formación de conjugados de PLA-COX [11].

En contraste con el encapsulado físico, en el que el rendimiento de carga de fármaco depende principalmente de los parámetros de formulación, en la conjugación química, el rendimiento de carga de fármaco está dictado por la longitud de cadena del polímero, que a su vez está determinada por las condiciones de polimerización, tales como la proporción de iniciador (DOX)-a-monómero. Por ejemplo, los conjugados de PLA-DOX sintetizados en el presente estudio se encontró que presentaban un peso molecular de 10 kDa y un índice de polidispersividad (IPD) estrecho de 1,16, correspondiente a un rendimiento de carga de aproximadamente 5% de DOX tras formular los conjugados en las NP (ver la figura 10).

3.3. Estabilidad in vitro de NP con cubierta de GRm cargadas con DOX

A continuación, el inventor estudió la estabilidad de las NP con cubierta de GRm cargadas con COX en soluciones tampón fisiológicamente relevantes. En PBS, se monitorizó la estabilidad de las NP mediante la medición de los tamaños de las NP en diferentes puntos temporales, ya que las partículas inestables tienden a agregar y sus tamaños se incrementan. En el presente estudio (figura 11A), las NP cargadas con moléculas de DOX mediante la utilización de encapsulado físico y conjugación química mostraron diámetros iniciales similares de ~ 90 nm sin incremento significativo de tamaño durante un periodo de una semana. De manera similar, sólo se observó un ligero cambio en las IDP de las NP en el mismo periodo de tiempo, indicando una elevada estabilidad de las NP con cubierta de GRm cargadas con DOX en PBS. Se examinó adicionalmente la estabilidad de las NP en suero mediante monitorización de la absorbancia de UV a 560 nm, una longitud de onda característica que refleja el grado de agregación de las partículas [14, 15]. Las NP con cubierta de GRm, cargadas con moléculas de DOX mediante encapsulado físico o conjugación química, mostraron una absorbancia prácticamente constante a 560 nm durante un periodo de dos horas (figura 11B), sugiriendo que las NP son altamente estables en suero de feto bovino al 100% (FBS). En contraste, la absorbancia de los núcleos poliméricos desnudos preparados a partir de PLGA o conjugados de PLA-DOX sin cubiertas de GRm se incrementó inmediatamente tras la adición a FBS. Estos resultados demuestran que la cubierta de GRm desempeña un papel significativo en la estabilización de las NP tanto en soluciones tampón como en suero. Desde una perspectiva práctica, la rápida agregación de las partículas poliméricas no recubiertas en soluciones tampón proporcionó un modo de precipitación selectiva y eliminación de las partículas no recubiertas a partir de las NP con cubierta de GRm después de su preparación.

3.4. Cinética de liberación de DOX a partir de NP con cubierta de GRm

Tras la formulación de NP con cubierta de GRm cargadas con DOX estables, en el contexto de la presente invención se pasó a investigar su cinética de liberación de DOX (figura 12). En primer lugar, en el contexto de la

presente invención se investigó cómo los diferentes mecanismos de carga de fármaco podrían afectar a la liberación de la DOX a partir de las NP con cubierta de GRm. Los resultados mostraron que, al encapsular físicamente las moléculas de DOX en la matriz de polímero, la tasa de liberación de fármaco era significativamente más rápida, ya que el 20% de las moléculas de DOX eran liberadas dentro de las primeras dos horas a partir de las NP con cubierta de GRm. En contraste, al examinar las formulaciones de conjugación química, dentro de las primeras dos horas, sólo el 5% de las moléculas de DOX era liberado. Dicha diferencia se ha atribuido al hecho de que el enlace covalente de las moléculas de DOX al esqueleto de polímero requiere que las moléculas de fármaco en primer lugar sean hidrolizadas del polímero por erosión en masa antes de que puedan difundirse hacia el exterior de la matriz de polímero para su liberación [11, 12, 16]. Un perfil de liberación más sostenida resultante de la conjugación covalente de fármaco-polímero también sugiere que los conectores químicos sensibles a inductores ambientales puedan conseguir una liberación de fármaco mejor controlada en el desarrollo de NP con cubierta de GRm para aplicaciones avanzadas de administración de fármaco [13, 17].

Con el fin de obtener una mejor comprensión del papel desempeñado por la cubierta de GRm en la retención del fármaco, en el contexto de la presente invención se siguió un procedimiento establecido para generar NP mediante la mezcla de copolímeros de dibloque PLA-PEG y resultaron en NP PEGiladas, en las que los núcleos de las NP se recubrieron y se estabilizaron con una capa de PEG circundante en lugar de una cubierta de GRm [18]. En el caso de que dos formulaciones presenten núcleos de NP similares, la diferencia de liberación de fármaco está causada principalmente por las diferentes capacidades de la cubierta de GRm y del recubrimiento superficial de PEG de retener el fármaco. Mediante la comparación de la liberación de DOX a partir de NP con cubierta de GRm con la de las NP PEGiladas, en el contexto de la presente invención se descubrió que la tasa de liberación de las NP con cubierta de GRm era más baja: se liberaba aproximadamente 20% de la DOX en las primeras 72 horas en las NP con cubierta de GRm mientras que se liberaba 40% de la DOX a partir de las NP PEGiladas durante el mismo periodo de tiempo. De hecho, mediante la utilización de NP formuladas con copolímeros de dibloque de PLGA-PEG, se ha encontrado que las moléculas superficiales de PEG dificultan la liberación de fármaco a partir de los núcleos de NP [19].

Por lo tanto, la observación de que se libera la DOX a una tasa más alta a partir de las NP recubiertas de PEG que de las NP con cubierta de GRm indica que las GRm en efecto actúan como barrera a la difusión para la liberación de la DOX. Esta observación también concuerda con estudios anteriores que muestran que el recubrimiento de fosfolípidos puede actuar como una barrera a la difusión del fármaco [20]. Dicho papel desempeñado por la cubierta de GRm sugiere además que las estrategias destinadas a construir recubrimientos de membrana lipídica podrían permitir liberaciones de fármaco reactivas a partir de NP con cubierta de GRm bajo determinadas señales medioambientales además de las conseguidas mediante conjugación química incluida en núcleos de polímero [21].

Con el fin de obtener una comprensión cuantitativa del efecto de recubrimiento con membrana sobre la retención del fármaco, se analizaron los perfiles de liberación del fármaco utilizando modelos matemáticos establecidos en estudios previos de liberación de fármaco a partir de partículas. Debido a que la degradación del PLGA se produce en semanas [22, 23], marcadamente más lenta que la liberación de fármaco observada en los sistemas cargados físicamente, se aplicó un modelo de Higuchi de difusión dominante tanto a NP con cubierta de GRm como a NP PEGiladas que contenían DOX encapsulada físicamente. La representación gráfica del porcentaje de liberación de fármaco frente a la raíz cuadrada del tiempo rindió ajustes lineales con $R^2=0,98$ y $0,96$ para las NP con cubierta de GRm y PEGiladas, respectivamente (figura 12B). La bondad de ajuste implica un mecanismo de liberación de fármaco controlado por la difusión y permite además derivar un coeficiente de difusión mediante las ecuaciones de Higuchi siguientes [24, 25]:

$$M_t = Kt^{1/2} \quad (1)$$

$$K = A(2C_{int}DC_s)^{1/2} \quad (2)$$

en las que M_t es la liberación de fármaco en t en horas, K es la constante de Higuchi, C_{int} es la concentración inicial de fármaco, C_s es la solubilidad del fármaco, A es la superficie total de las partículas y D es el coeficiente de difusión. Dadas las dimensiones de las partículas, el rendimiento de carga de fármaco, la solubilidad de DOX en agua (1,18 g/l) y los datos de liberación de fármaco, se determinaron los coeficientes de difusión en $6,6 \times 10^{-16}$ cm^2/s y $8,2 \times 10^{-16}$ cm^2/s para las NP con cubierta de GRm y PEGiladas, respectivamente, que también son consistentes con las difusividades de fármaco anteriormente informadas para las NP de PLGA/PLA [26]. En el estudio de los presentes inventores, el recubrimiento de membrana bicapa redujo la difusividad del fármaco en 1,2 veces. El efecto de retardo por la cubierta de GRm probablemente variará según los diferentes tamaños de partícula, tipos de polímero y cargas terapéuticas.

Por otra parte, aplicando modelos de orden cero, de primer orden y de Higuchi a los perfiles de liberación de fármaco de DOX conjugada químicamente rindió ajustes pobres (datos no mostrados), indicando una cinética de liberación completa al acoplar un corte adicional del fármaco con la difusión de salida de la matriz de polímero. El modelado preciso del efecto de retardo impuesto por la cubierta de GRm sobre la DOX conjugada químicamente

se encuentra más allá del alcance del presente estudio.

Sin embargo, debido a que se encuentran presentes núcleos de partícula idénticos en NP tanto con cubierta de GRm como PEGiladas, la relajación de la matriz de polímero y el corte hidrolítico del enlace no son factores dominantes que contribuyan a la diferencia observada en los perfiles de liberación de DOX. Por el contrario, en el contexto de la presente invención se atribuye la tasa de liberación más lenta de las NP con cubierta de GRm a dos componentes dominados por la difusión: la difusión del agua hacia el interior de la matriz de polímero y la difusión de los fármacos cortados hacia el exterior a través de la matriz de polímero [27]. Debido a que se mostró que el recubrimiento de membrana reducía la difusividad del fármaco en el sistema de atrapamiento físico, probablemente resulta afectado tanto por el flujo de entrada de agua como por el flujo de salida de los fármacos cortados en el sistema de conjugado covalente, resultando de esta manera en un perfil de liberación de fármaco más sostenida.

3.5. Citotoxicidad de las NP con cubierta de GRm cargadas con DOX

Por último, en el contexto de la presente invención se examina el potencial terapéutico de las NP con cubierta de GRm cargadas de DOX con la estirpe celular de LMA Kasumi-1. La LMA, una enfermedad caracterizada por un crecimiento incontrolado y la acumulación de blastos leucémicos en el torrente sanguíneo, se seleccionó como enfermedad diana debido a la larga vida en circulación de las NP con cubierta de GRm en el torrente sanguíneo y sus perfiles de liberación sostenida de fármaco. El estándar de cuidado actual de la LMA son las antraciclinas a dosis elevada, que plantean el grave problema de la toxicidad cardíaca [28]. Las NP de circulación prolongada que liberan compuestos terapéuticos de manera sostenida ofrecen la oportunidad de reducir la administración necesaria y de mejorar la eficacia del tratamiento. Las NP con cubierta de GRm, en las que se ha cargado físicamente o se ha conjugado covalentemente la DOX, mostraron una toxicidad más elevada que la DOX libre durante un periodo de incubación de 72 horas (figura 13). Esta potenciación de la eficacia puede atribuirse probablemente a la incorporación endocítica de NP, que permite que una carga útil elevada de fármacos entre en la región intracelular [29]. La DOX libre, en contraste, se basa en la difusión membranal pasiva para la entrada celular, la cual es menos eficiente y susceptible de bombas de eflujo de fármaco unidas a membrana [30-32]. El presente estudio sugiere que las NP con cubierta de GRm, con un tiempo de vida en circulación prolongado, liberación de fármaco sostenida e internalización celular mejorada, son una plataforma para el tratamiento del cáncer sanguíneo. Se justifican estudios adicionales para investigar el potencial terapéutico de estas NP in vivo.

Conclusiones

En resumen, en la presente memoria se han examinado dos estrategias para la carga de fármacos en un sistema de administración de NP con cubierta de GRm: encapsulado físico y conjugación química. Los estudios de liberación sugieren que la estrategia de conjugación química resultaba en un perfil de liberación de fármaco más sostenida. En el contexto de la presente invención se ha formulado además NP PEGiladas que presentan los mismos núcleos de NP pero diferentes recubrimientos superficiales que las NP con cubierta de GRm. Mediante la comparación de los perfiles de liberación de fármaco de dichos dos sistemas de administración, en el contexto de la presente invención se ha demostrado que la cubierta de GRm proporciona una barrera que retarda la difusión hacia afuera de las moléculas de fármaco encapsuladas. Estos resultados proporcionan las modificaciones químicas del enlace de fármaco-polímero en el núcleo de NP y la manipulación de los recubrimientos superficiales de las NP puede mejorar el control sobre la liberación de fármaco de las NP con cubierta de GRm. En un estudio de eficacia posterior que utilizaba la estirpe celular de LMA Kasumi-1, las NP con cubierta de GRm mostraron una toxicidad más elevada que la DOX libre. El tiempo de vida en circulación sistémica prolongado observado anteriormente en el torrente sanguíneo y la cinética de liberación sostenida de fármaco informada en la presente memoria indican que este sistema biomimético de administración de fármaco proporciona una administración sistémica viable de las cargas útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como los cánceres sanguíneos. Estas NP con cubierta de GRm proporcionan un robusto sistema de administración de fármaco que combina las ventajas de los polímeros sintéticos y las membranas celulares naturales.

Las NP con cubierta de GRm representan una nueva clase de formulaciones de NP que combinan una larga vida en circulación de los GR y una retención y liberación controladas del fármaco y de los polímeros sintéticos. Dicha formulación de NP puede adaptarse adicionalmente mediante manipulación de ambas partes con el fin de mejorar la administración sistémica de las cargas útiles terapéuticas. Dicha formulación proporciona una robusta plataforma de administración y presenta impactos significativos sobre las aplicaciones biomédicas y la investigación nanotecnológica.

El resumen ejecutivo del presente ejemplo se proporciona a continuación:

con el fin de combinar las ventajas de la larga vida en circulación de los GR y la retención y liberación controladas del fármaco a partir de partículas poliméricas, en el contexto de la presente invención se ha formulado NP con cubierta de GRm en tamaños sub-100 nm, que contienen: núcleos poliméricos sub-100 nm preparados a partir de PLA o PLGA y un exterior de eritrocito preparado a partir de GRm con proteínas membranales conservadas.

En el contexto de la presente invención se examinaron dos métodos diferentes de carga de DOX como fármaco modelo en las NP con cubierta de GRm: el encapsulado físico, que resulta en rendimientos de carga de entre 0,9% y 1,8%, y la conjugación covalente, que resulta en un rendimiento de carga aproximado de 5%.

Mediante la monitorización de los tamaños de las NP y la absorbancia de UV, en el contexto de la presente invención se ha encontrado que las NP con cubierta de GRm presentan una estabilidad superior a los núcleos poliméricos desnudos sin cubiertas de GRm, implicando que la cubierta de GRm desempeña un papel significativo en la estabilización de las NP en soluciones biológicas.

Los estudios de liberación muestran que el enfoque de conjugación covalente de fármaco-polímero presenta un perfil de liberación más sostenida que el encapsulado físico, demostrando que los conectores químicos reactivos a inductores medioambientales pueden conseguir una liberación de fármaco mejor controlada durante el desarrollo de NP con cubierta de GRm para las aplicaciones avanzadas de administración de fármaco.

Mediante la comparación de las NP con cubierta de GRm y las NP PEGiladas en el contexto de la presente invención se ha encontrado que las GRm actúan como barrera a la difusión para la liberación de DOX. Esta observación era consistente con el análisis cuantitativo con las ecuaciones de Higuchi. Por lo tanto, las estrategias destinadas a la manipulación de los recubrimientos de membrana lipídica también permiten una liberación de fármaco reactivo a partir de NP con cubierta de GRm bajo determinadas señales medioambientales.

Las NP con cubierta de GRm cargadas de DOX potenciaron la eficacia contra las células de LMA Kasumi-1 en comparación con DOX libre. Esta potenciación de la eficacia puede atribuirse probablemente a la incorporación endocítica de NP, que permite que una carga útil elevada de fármacos entre en la región intracelular.

Referencias

1. Davis ME, Chen Z, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7(9), 771-782 (2008).
2. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(8), 615-627 (2010).
3. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2(12), 751-760 (2007).
4. Farokhzad OC, Langer R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano* 3(1), 16-20 (2009).
5. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 5(4), 505-515 (2008).
6. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. (1999) *Angew. Chem. Int. Edit.* 49(36), 6288-6308 (2010).
7. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* 2(4), 249-255 (2007).
8. Yoo J-W, Chambers E, Mitragotri S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects. *Curr. Pharm. Design* 16(21), 2298-2307 (2010).
9. Hu CM, Zhang L, Aryal S, Cheung C, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(27), 10980-10985 (2011).
10. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119-130 (1963).
11. Aryal S, Hu CM, Zhang L. Polymeric nanoparticles with precise ratiometric control over drug loading for combination therapy. *Mol. Pharm.* 8(4), 1401-1407 (2011).
12. Tong R, Cheng J. Ring-opening polymerization-mediated controlled formulation of polylactide-drug nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 131(13), 4744-4754 (2009).
13. Aryal S, Hu CM, Zhang L. Polymer--cisplatin conjugate nanoparticles for acid-responsive drug delivery. *ACS Nano* 4(1), 251-258 (2010).

14. Popielarski SR, Pun SH, Davis ME. A nanoparticle-based model delivery system to guide the rational design of gene delivery to the liver. 1. Synthesis and characterization. *Bioconjug. Chem.* 16(5), 1063-1070 (2005).
- 5 15. Fang RH, Aryal S, Hu CM, Zhang L. Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir* 26(22), 16958-16962 (2010).
16. Tong R, Cheng J. Controlled Synthesis of Camptothecin-Polylactide Conjugates and Nanoconjugates. *Bioconjug. Chem.* 21(1), 111-121 (2010).
- 10 17. Gao W, Chan JM, Farokhzad OC. pH-Responsive Nanoparticles for Drug Delivery. *Mol. Pharm.* 7(6), 1913-1920 (2010).
18. Gu F, Zhang L, Teply BA et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(7), 2586-2591 (2008).
- 15 19. Takae S, Miyata K, Oba M et al. PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130(18), 6001-6009 (2008).
- 20 20. Zhang L, Chan JM, Gu FX et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: A robust drug delivery platform. *ACS Nano* 2(8), 1696-1702 (2008).
21. Pornpattananangkul D, Zhang L, Olson S et al. Bacterial Toxin-Triggered Drug Release from Gold Nanoparticle-Stabilized Liposomes for the Treatment of Bacterial Infection. *J. Am. Chem. Soc.* 133(11), 4132-4139 (2011).
- 25 22. Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, Klepetsanis P, Karydas AG, Ithakissios DS. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in Vivo drug residence in blood properties. *J. Control. Release* 79(1-3), 123-135 (2002).
- 30 23. Li J, Jiang G, Ding F. The effect of pH on the polymer degradation and drug release from PLGA-mPEG microparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* 109(1), 475-482 (2008).
24. Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 50, 874-875 (1961).
- 35 25. Siepmann J, Peppas NA. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse. *Int. J. Pharm.* 418(1), 6-12 (2011).
- 40 26. Budhian A, Siegel SJ, Winey KI. Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 346(1-2), 151-159 (2008).
27. Pitt CG, Schindler A. The kinetics of drug cleavage and release from matrices containing covalent polymer-drug conjugates. *J. Control. Release* 33(3), 391-395 (1995).
- 45 28. Lowenberg B, Ossenkuppele GJ, van Putten W et al. High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia. *New Engl. J. Med.* 361(13), 1235-1248 (2009).
29. Hu C-MJ, Zhang L. Therapeutic Nanoparticles to Combat Cancer Drug Resistance. *Curr. Drug Metab.* 10(8), 836-841 (2009).
- 50 30. Huwylar J, Cerletti A, Fricker G, Eberle AN, Drewe J. By-passing of P-glycoprotein using immunoliposomes. *J. Drug Target.* 10(1), 73-79 (2002).
- 55 31. Rapoport N, Marin A, Luo Y, Prestwich GD, Muniruzzaman M. Intracellular uptake and trafficking of pluronic micelles in drug-sensitive and MDR cells: Effect on the intracellular drug localization. *J. Pharm. Sci.* 91(1), 157-170 (2002).
32. Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced anti proliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.* 2(5), 373-383 (2005).
- 60

Ejemplo 3

Nanopartículas con membranas de células de cáncer para la inmunoterapia personalizada

65 El presente ejemplo proporciona un sistema inmunoterapéutico que presenta varias ventajas respecto a los

enfoques existentes.

- 5 1) Las estrategias actuales se concentran sólo en antígenos asociados a tumores individuales (AAT) que expresa el tipo general de cáncer en cuestión. El cáncer es una enfermedad heterogénea y una limitación de dicho enfoque es que la expresión de antígenos del cáncer de un paciente podría ser completamente diferente del de otro. Lo anterior conduce a un porcentaje inferior al óptimo de pacientes que son candidatos reales para recibir dichos tratamientos. Otro problema es que utilizar como diana un único AAT conduce a una respuesta inmunológica global débil contra el cáncer, permitiendo que éste finalmente mute y desarrolle resistencia. La invención descrita resuelve dichos problemas mediante la adaptación del tratamiento a cada paciente individual mediante la recolección de material membranal de sus tumores autólogos. Este enfoque permite una recreación exacta del perfil de expresión de antígenos en la nanopartícula, proporcionando al sistema inmunológico una oportunidad para montar una respuesta fuerte en múltiples frentes contra el cáncer.
- 10
- 15 2) Otra limitación de las estrategias actuales es que mayoritariamente requieren la conjugación química de los AAT con el adyuvante inmunológico. Lo anterior se lleva a cabo para colocalizar el antígeno y el adyuvante, lo que en última instancia permite al sistema inmunológico montar una respuesta contra autoantígenos que, de otro modo, presentarían una baja inmunogenicidad. El problema con dicho enfoque es que las conjugaciones químicas con frecuencia distorsionan los antígenos, resultando en una presentación pobre por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA). Además, la naturaleza aleatoria de las conjugaciones químicas puede conducir a rendimientos bajos y resulta en la incapacidad de generalizar dicho sistema para la utilización con diferentes tipos de AAT. La invención descrita resuelve ambos problemas anteriormente indicados. Mediante la traslocación de la membrana celular entera a la nanopartícula, la totalidad de los AAT membranales superficiales se encuentra en su medio nativo y, por lo tanto, son fielmente presentados por las CPA en su forma nativa. La utilización de un núcleo de nanopartícula permite la coadministración de adyuvante inmunológico y material antigénico a proporciones de adyuvante a antígeno ajustables, algo que no puede llevarse a cabo con los sistemas tradicionales conjugados químicamente.
- 20
- 25
- 30 3) La mayoría de vacunas actuales del cáncer son compuestos pequeños con farmacocinética y biodistribuciones desfavorables. Una vez inyectados in vivo, dichos compuestos pueden difundirse alejándose del sitio diana o resultar degradados antes de la incorporación por CPA. La invención descrita resuelve lo anterior en una diversidad de modos. En primer lugar, debido a que la membrana está soportada por una superficie de nanopartícula, es mucho menos probable que se fusione con dianas no deseadas. De esta manera, los antígenos pueden conservarse y estabilizarse en su forma óptima hasta la incorporación por CPA. Adicionalmente, los sistemas de nanopartículas son órdenes de magnitud mayores que los compuestos pequeños; el tamaño de las nanopartículas también puede afinarse en un intervalo grande. Mediante el control del tamaño del núcleo de nanopartícula puede ser de aproximadamente 200 a 300 nm, puede evitarse la difusión alejándose del sitio diana, permitiendo que las CPA entren e incorporen las partículas eficientemente. Simultáneamente, el pequeño tamaño de las nanopartículas también permite maximizar la superficie sobre la que puede residir el material de membrana, conduciendo a la administración de más material antigénico en cada dosis.
- 35
- 40

45 El presente ejemplo proporciona que el material de membranas de células de cáncer se derive del tumor de un paciente o de una estirpe celular establecida y se utilice para recubrir nanopartículas con adyuvante inmunológico cargado en el interior con el fin de crear una potente vacuna para el cáncer (figura 14). Utilizando dicha plataforma, resulta posible administrar la totalidad del material antigénico a partir de la superficie de una célula de cáncer en células presentadoras de antígenos (CPA). Adicionalmente, la coadministración de un adyuvante inmunológico permitirá que el sistema inmunológico monte una respuesta fuerte contra material de otro modo débilmente inmunogénico. Esta estrategia puede utilizarse para tratar un amplio abanico de tipos de cáncer, incluyendo, aunque sin limitación, cáncer de vejiga, cáncer óseo, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer hepático, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer pulmonar, cáncer de piel y cáncer de próstata.

50

55 La vacuna para el cáncer descrita puede utilizarse con fines tanto preventivos como terapéuticos. Mediante la utilización de líneas de células de cáncer establecidas como la fuente de membranas, los pacientes pueden vacunarse contra cánceres que expresan motivos antigénicos comunes. Por otra parte, mediante la utilización de material de membranas derivado del tumor de un paciente individual, puede montarse una respuesta inmunológica fuerte contra el tipo de cáncer exacto del paciente. Lo anterior presentaría amplias implicaciones para el tratamiento de cáncer dada la heterogeneidad de la enfermedad de paciente a paciente.

60

Preparación del tratamiento:

- 65 1) Se derivan células de cáncer del tumor reseccionado de un paciente o de una estirpe celular de cáncer común,

2) El material de membrana se deriva de las células utilizando un método, tal como el fraccionamiento. Un ejemplo es el siguiente:

- Las células de cáncer se homogeneizan mecánicamente para romper las membranas.
- El homogenado se centrifuga para peletizar el contenido intracelular y se recoge el sobrenadante con las membranas.

3) Se preparan nanopartículas cargadas con adyuvante utilizando un método tal como la nanoprecipitación. Un ejemplo es el siguiente:

- Se disuelve polímero (p.ej., PLGA) y adyuvante (p.ej., monofosforil-lípido A) en una fase orgánica.
- La fase orgánica se nanoprecipita en una fase acuosa para formar nanopartículas del tamaño deseado.

4) Las partículas inmunoterapéuticas finales se preparan de la manera siguiente:

- El material de membrana recogido de las células de cáncer se extrusiona físicamente para generar vesículas membranales más pequeñas.
- Los núcleos cargados de adyuvante, preparados previamente, se extrusionaron junto con las vesículas para formar las partículas finales (figura 15).

Administración de tratamiento:

- 1) La formulación de nanopartículas se administra por vía subcutánea.
- 2) Alternativamente, el tratamiento se administra por vía intravenosa.

Mecanismo de acción (figura 16):

- 1) Tras la inyección en el paciente, se induce una respuesta inmunológica primaria.
- 2) Las CPA migran al sitio de inflamación e incorporan las partículas.
- 3) Tras la incorporación, las partículas se degradan, liberando el adyuvante inmunológico.
- 4) Tras detectar el adyuvante inmunológico, las CPA maduran.
- 5) El material antigénico que se encontraba sobre la superficie de las nanopartículas ahora es presentado sobre el exterior de las CPA.
- 6) Los antígenos sobre las CPA maduras son presentados a las células T CD8⁺.
- 7) Tras interactuar con los antígenos específicos de cáncer, las células T CD8⁺ se activan y se tornan células T citotóxicas, y
- 8) Las células T citotóxicas contra los antígenos de las células de cáncer proliferan y atacan el tumor.

El presente ejemplo proporciona una vacuna inmunoterapéutica basada en nanopartículas recubiertas con células de cáncer y la viabilidad de la fabricación de dicha vacuna (figura 17). En el contexto de la presente invención se ha confirmado que resulta posible fabricar nanopartículas recubiertas con membranas de células de cáncer con cargas activas encapsuladas. El material de membranas derivado de las células de cáncer no presenta un gran contenido intracelular y resulta eficientemente translocado a la superficie de las nanopartículas. Adicionalmente, en el contexto de la presente invención se ha confirmado que, tras la incorporación por una célula, el contenido del núcleo de las nanopartículas y el material membranal externo se colocalizan, lo que representa la información más importante que verifica un diseño con éxito. En la presente memoria, en el contexto de la presente invención se llevaron a cabo experimentos in vitro e in vivo que resultan necesarios para demostrar la eficacia de la plataforma. Entre estos experimentos se incluyen: 1) confirmar la presentación de material antigénico de las células de cáncer mediante el pulsado de células dendríticas inmaduras con la formulación de nanopartículas de los presentes inventores, 2) confirmar la activación de las células T CD8⁺ tras el cocultivo con células dendríticas maduras del primer experimento, 3) determinar la eficacia terapéutica in vivo utilizando un C57BL/6 con un modelo murino de melanoma B16 y observar la reducción del tamaño tumoral tras la administración directa del tratamiento.

La invención descrita presenta un enorme potencial de comercialización. Debido a que resulta fácil de fabricar, es personalizable a cada paciente individual y puede generalizarse a prácticamente cualquier forma de cáncer, dicha tecnología podría encontrarse eventualmente en la primera línea del tratamiento del cáncer. En el lado terapéutico, dicho tratamiento inmunoterapéutico puede utilizarse junto con la cirugía. Se utiliza el material de los

tumores reseccionados para preparar la vacuna, que se administra en el paciente para destruir cualquier tumor remanente y evitar la recurrencia del tumor. En el lado preventivo, el tratamiento puede generalizarse para utilizar líneas celulares establecidas de cánceres comunes para la vacunación contra muchos tipos de cáncer.

5 Referencias:

1. Cho, Nam-Hyuk et al. "A Multifunctional Core-Shell Nanoparticle for Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy." *Nature Nanotechnology*: 6, 675-82 (2011).
- 10 2. Li, Haiyan et al. "Alpha-Alumina Nanoparticles Induce Efficient Autophagy-Dependent Cross-Presentation and Potent Antitumour Response." *Nature Nanotechnology* 6, 645-650 (2011).
- 15 3. Moon, James J et al. "Interbilayer-Crosslinked Multilamellar Vesicles as Synthetic Vaccines for Potent Humoral and Cellular Immune Responses." *Nature Materials* 10.3 (2011): 243-251.
4. Tongchusak, S et al. "Induction of Anti-Tumor Cytotoxic T Cell Responses Through PLGA-Nanoparticle Mediated Antigen Delivery." *Biomaterials* (2011), 32(14):3666-78.

20 Ejemplo 4

Nanoesponjas de toxina biomimética

El tratamiento antitoxina ofrece el potencial de limpiar el cuerpo de factores de virulencia que subyacen a numerosas amenazas para la salud, incluyendo infecciones bacterianas, lesiones venenosas y armas biológicas. Sin embargo, a pesar de los crecientes esfuerzos en el desarrollo de antitoxinas, las opciones de tratamiento seguras y eficaces siguen siendo limitadas. En la presente memoria, en el contexto de la presente invención se construye una nanoesponja biomimética y se demuestra su capacidad de absorber y neutralizar la α -toxina de *Staphylococcus aureus*. Estas nanoesponjas, que consisten en bicapas de membrana de GR soportadas sobre nanopartículas poliméricas, absorben fácilmente la toxina dañina para las membranas y las apartan de sus dianas celulares. En un modelo de ratón, las nanoesponjas reducen marcadamente la toxicidad de la toxina. Esta nanoformulación de inspiración biológica representa un avance en la nanomedicina para los tratamientos antitoxina.

La creciente conciencia de las enfermedades y lesiones mediadas por toxinas ha motivado la búsqueda de soluciones antitoxina más seguras y eficaces. Además, la terapia antivirulencia con diana en toxinas emerge como una convincente estrategia contra las enfermedades infecciosas, en medio de una creciente amenaza de las bacterias resistentes a antibióticos (1). Las plataformas antitoxina existentes, tales como los antisueros (2), los anticuerpos monoclonales (3, 4), los inhibidores de molécula pequeña (5, 6) y los polímeros de impresión molecular (7, 8) neutralizan las toxinas mediante la utilización como diana de sus estructuras moleculares. Sin embargo, algunos factores, incluyendo la elevada inmunogenicidad, la baja biocompatibilidad, la pobre farmacocinética, así como la necesidad de síntesis personalizada específica de toxina limita su adopción clínica. Utilizando un polímero PLGA biodegradable y los componentes membranales de los glóbulos rojos, en el contexto de la presente invención se construye una nanoesponja biomimética con diana en el mecanismo de acción de las toxinas formadoras de poro (TFP).

Las TFP son las toxinas proteicas más comunes en la naturaleza (9, 10). Estas toxinas rompen las células mediante la formación poros en las membranas celulares y alteran su permeabilidad. En las infecciones bacterianas, el ataque por las TFP constituye un mecanismo de virulencia principal al desempeñar un papel clave en la defensa y nutrición microbianas (10). Se ha encontrado que, en *Staphylococcus aureus*, el nivel de expresión de α -toxina dañina para las membranas se correlaciona directamente con la virulencia de la cepa (11). Algunos estudios han demostrado que la inhibición de la α -toxina puede reducir la severidad de las infecciones por *S. aureus* (11, 12) y algunas estrategias con diana en TFP similares han demostrado un potencial terapéutico contra otros patógenos, incluyendo *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* (13), *Listeria monocytogenes* (14, 15), *Bacillus anthracis* (16) y *Streptococcus pneumoniae* (17, 18).

Aparte de su papel en la patogénesis bacteriana, las TFP se utilizan comúnmente en ataques con veneno por animales, incluyendo los de anémonas marinas, escorpiones y serpientes (19). Se puesto de manifiesto que los tratamientos eficaces contra dichas extendidas toxinas citolíticas resolvería una multitud de cuestiones relacionadas con la salud. Se han identificado más de 80 familias de TFP, que muestran estructuras moleculares diversas y dianas epitópicas diferentes. A pesar de estas diferencias, la similitud funcional entre estas toxinas en la perforación de las membranas celulares proporciona la clave de diseño para una plataforma antitoxina con diana en un mecanismo, de amplia aplicabilidad. En general, las TFP rompen las membranas celulares mediante la incorporación espontánea en bicapas fosfolipídicas. Esta tendencia a interactuar con las membranas lipídicas ha inspirado varias aplicaciones basadas en las plataformas de membrana bicapa (20-22). En la presente memoria, en el contexto de la presente invención se aplica la utilización de membranas de GR estabilizadas por nanopartículas para absorber y detener las proteínas dañinas para las membranas. Utilizando la α -toxina

estafilocócica como modelo de TFP, en el contexto de la presente invención se ha demostrado que estas nanoesponjas pueden neutralizar la virulenta actividad formadora de poros de la toxina (figura 18A).

5 Se prepararon las nanoesponjas de toxina mediante la extrusión de vesículas de membranas de glóbulos rojos con nanopartículas de PLGA de 70 nm (figura 22), rindiendo una nanoestructura de núcleo-cubierta de aproximadamente 85 nm de diámetro (figura 18B, 18C). Las vesículas de membranas de GR se derivaron de GR purificados a partir de la sangre completa de ratones y las partículas de PLGA se prepararon mediante un procedimiento de nanoprecipitación. Esta técnica de recubrimiento con membranas de glóbulos rojos se ha informado anteriormente que camufla las nanopartículas, mejorando su estabilidad en suero y extendiendo su
10 semivida en circulación in vivo (23): En el presente estudio, se observa la interacción entre dichas membranas de GR soportadas por partículas y la α -toxina hemolítica. Bajo microscopía electrónica de transmisión, las nanoesponjas revelan una estructura de núcleo-cáscara que consiste en un núcleo polimérico envuelto en bicapas de GR (figura 18C).

15 Con el fin de establecer la capacidad de las nanoesponjas de neutralizar la α -toxina, se mezclaron 200 μ g de nanoesponjas con 3 μ g de α -toxina en PBS durante 30 min. La mezcla seguidamente se mezcló con 5% de GR de ratón purificados. A título comparativo, se mezcló con la toxina una cantidad equivalente de partículas de PLGA PEGiladas, liposomas PEGilados y vesículas de membranas de GR de tamaños comparables. Tras 30 min de incubación, las soluciones se centrifugaron y se observó el sobrenadante para hemoglobina liberada. Tal
20 como se muestra en la figura 19A, la muestra de nanoesponjas era notablemente diferente de las otras muestras, mostrando un sobrenadante transparente que indica que los GR se encontraban intactos. Utilizando soluciones de GR tratadas con toxina y tratadas con PBS a modo de controles positivo y negativo, se cuantificó el grado de hemólisis mediante la medición de la absorbancia del sobrenadante a 540 nm. Aunque las nanopartículas de PLGA PEGiladas, los liposomas PEGilados y las vesículas de membranas de GR no consiguieron detener la actividad hemolítica de la toxina, la muestras con nanoesponjas mostró una inhibición
25 completa de la toxina.

Con el fin de elucidar mejor el mecanismo tras la inhibición de la α -toxina, las mezclas de nanoformulaciones/toxina se filtraron por una columna Sepharose® CL-4B para separar la toxina no unida de
30 flotación libre. Dada la tendencia de la α -toxina de incorporarse espontáneamente en las membranas de eritrocitos (24) y en las bicapas membranales soportadas sobre sustrato (25), se esperaba que las vesículas de membranas de GR y las nanoesponjas retuviesen la toxina tras pasarlas por la columna de filtración. Tras el análisis de SDS-PAGE, se encontró que tanto las vesículas de membranas de GR como las nanoesponjas retenían la mayor parte de la α -toxina (95,3% y 90,2%, respectivamente), tal como indicaba la banda de proteína
35 de 34 kDa de intensidad similar a la de la toxina de referencia (figura 19C). Por otra parte, la banda de proteína toxina era prácticamente inexistente en las muestras de NP de PLGA PEGilada y de liposomas PEGilados (3,4% y 4,7%, respectivamente), lo que sugiere que las formulaciones PEGiladas presentaban poca interacción con la toxina. Esta falta de retención de la toxina puede atribuirse al recubrimiento de PEG hidrófilo, que bloquea las interacciones entre proteínas mediante repulsiones estéricas. Las nanoesponjas, que son estabilizadas por un
40 núcleo sólido y camufladas por componentes de membrana de GR, pueden interactuar directamente con las dianas toxinas.

Aunque las vesículas de membranas de GR también absorbían α -toxina, su fracaso en la reducción de la actividad hemolítica de la toxina subraya el papel del núcleo polimérico en las nanoesponjas. Con el fin de
45 entender mejor la disparidad entre las capacidades de neutralización de las vesículas de membranas de GR y las nanoesponjas, se llevó a cabo un estudio de incorporación celular utilizando las dos nanoformulaciones preparadas con un pigmento membranal, la DMPE-rodamina. La microscopía de fluorescencia revela de forma clara los diferentes destinos de las dos nanoformulaciones tras la incubación con las células (figura 19D). En la muestra con vesículas de membranas de GR, se observaba una fluorescencia roja ampliamente distribuida sobre
50 toda la superficie celular, que puede explicarse por la fusión de estas vesículas inestabilizadas con la membrana celular. Esta observación es consistente con estudios anteriores sobre las vesículas liposómicas de membranas de GR, que fueron fácilmente adsorbidas sobre las membranas celulares y no experimentaron endocitosis celular (26). En contraste, las nanoesponjas se observaron como partículas fluorescentes claras dentro de la región intracelular, demostrando la capacidad de los núcleos poliméricos de establecer el componente de membrana de
55 los GR y permitir su incorporación celular. Estos resultados ayudan a justificar los resultados del estudio de hemólisis, en el que las vesículas de GR con α -toxina unida probablemente se fusionaron con los GR y, de esta manera, no consiguieron bloquear la hemólisis. Por otra parte, las nanoesponjas fueron capaces de detener la toxina y mantenerla alejada de las demás membranas de GR. Además, la figura 19D sugiere que las nanoesponjas podían facilitar la incorporación endocítica de la toxina unida a membrana. Este mecanismo de
60 entrada inducido por nanopartículas potenciaría la digestión endolisosómica de las proteínas adsorbidas, evitando daños adicionales que podría producir la toxina.

Con el fin de caracterizar adicionalmente las nanoesponjas, se examinó la capacidad de adsorción de la toxina mediante estudios de titulación. Se incubaron diferentes cantidades de α -toxina con 200 μ l de 1 mg/ml de
65 nanoesponjas en PBS durante 30 min. A modo de control se prepararon las mismas concentraciones de α -toxina en ausencia de las nanoesponjas. Las mezclas de toxina/nanoesponjas seguidamente se añadieron a 1,8 ml de

solución de PBS que contenía 5% de GR y se monitorizó la hemólisis tras 30 min de incubación (figura 19E). En ausencia de las nanoesponjas, se observó una hemólisis significativa con 1,2 μg de α -toxina (42%) y se consiguió una hemólisis prácticamente completa con 3,6 μg de α -toxina. Sin embargo, con el tratamiento de nanoesponjas, se observó una hemólisis despreciable con hasta 9 μg de α -toxina y se consiguió una hemólisis completa con 30 μg de toxina. Estos datos indican que las nanoesponjas reducen significativamente la actividad de α -toxina pero presentan un límite de capacidad. Un estudio de titulación adicional de las nanoesponjas con el contenido de toxina global fijado en 9 μg reveló que la inhibición de la actividad hemolítica se correlacionaba directamente con la cantidad de nanoesponjas (figura 19F). Se dedujo que aproximadamente 9 μg de la toxina podía neutralizarse por completo con 200 μg de nanoesponjas. Basándose en los datos de titulación, tamaño de la nanoesponja, densidad de PLGA y peso molecular de la toxina, se estimó la capacidad de absorción de la nanoesponja en 173 monómeros de toxina por partícula. A título comparativo, la capacidad teórica de aproximadamente 2.000 monómeros de toxina por partícula se estimó a partir de la superficie de las nanoesponjas y la superficie de proyección de las proteínas toxinas. El menor valor experimental puede atribuirse al impedimento estérico entre las moléculas de toxina y a la presencia de proteínas de membrana de GR sobre la superficie de las nanoesponjas.

La capacidad de las nanoesponjas de neutralizar la α -toxina se sometió a ensayo in vivo mediante administración subcutánea. Se comparó la formación de lesiones en la piel en ratones 72 horas después de la inyección de α -toxina o mezcla de α -toxina/nanoesponja bajo la piel del flanco derecho. Tras una inyección de 150 μl a una concentración de 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, la α -toxina sola indujo lesiones severas en la piel con edema demostrable e inflamación en el grupo de control (figura 20A). Sin embargo, la mezcla con 100 μg de nanoesponjas (proporción de $\sim 69:1$ de toxina a partícula) aparentemente neutralizó la toxina, ya que no existían daños observables en los ratones (figura 20B). Un examen más detallado del tejido de la piel recogido del grupo de control mostró necrosis, apoptosis y infiltrado inflamatorio de neutrófilos con edema dérmico (figura 20C). Además, la toxina provocó daños en el tejido muscular subyacente, tal como pone de manifiesto el edema interfibrilar, los desgarros en las fibras musculares y un número significativo de neutrófilos extravasados procedentes de la vasculatura circundante (figura 20E). Lo anterior contrasta fuertemente con lo observado en las muestras de tejido de ratones que recibían la mezcla de toxina/nanoesponjas (figuras 20D y 20F), que mostraban estructuras epiteliales normales en la histología de la piel y estructuras fibrosas intactas sin infiltrados visibles en la histología del músculo (figuras 20D, 20F).

Se evaluó la capacidad de destoxicación de las nanoesponjas mediante la administración sistémica en los ratones. En primer lugar, se verificó la seguridad de las nanoesponjas mediante la inyección en los ratones de 80 mg/kg de nanoesponjas. La dosis resultó bien tolerada ya que el grupo inoculado no mostró mortalidad durante un periodo de 2 semanas (datos no mostrados). Tras confirmar la seguridad de la formulación, se examinaron los tratamientos tanto preinoculación como posinoculación. Se inyectó en la vena de la cola una dosis letal de bolo de α -toxina (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que es conocido que induce muerte aguda en ratones. En los dos grupos experimentales, se inyectaron 80 mg/kg de las nanoesponjas 2 min antes o 2 min después de la inyección de toxina. Se observó una tasa de mortalidad de 100% dentro de la 6 h de la inyección de toxina en el grupo de control (n=9, figura 21). En el grupo posinoculado con las nanoesponjas, la tasa de mortalidad se redujo marcadamente hasta el 56% (valor de p de 0,0091, n=9). La tasa de supervivencia se mejoró adicionalmente en el grupo preinoculación, en el que sólo se observó una tasa de mortalidad de 11% (valor de p <0,0001, n=9). El resultado sugiere que las nanoesponjas confieren protección frente a la α -toxina in vivo. El beneficio de las nanoesponjas se encontró que era más elevado al administrarlas profilácticamente, lo que no resulta inesperado dado la rápida cinética de la hemólisis con α -toxina (27). En ninguno de los grupos de tratamiento se observó muerte adicional después de la marca de 6 h, lo que sugiere que la toxina absorbida resultaba destoxicada y no que meramente se había retardado su toxicidad. Estos resultados indican las potenciales aplicaciones clínicas de estas nanoesponjas en contextos tanto preventivo como paliativo.

En conclusión, la nanoesponja, que consiste en una membrana de GR soportada en una nanopartícula de PLGA, se construyó como solución de antitoxina a la luz de las propiedades funcionales de las TFP. En el contexto de la presente invención se demuestra que la accesibilidad de las membranas y la estabilidad estructural son los aspectos clave que permiten la neutralización de la toxina mediante esta plataforma. Las nanoesponjas inhibieron la actividad hemolítica de la α -toxina in vitro y redujeron en gran medida los daños de la toxina en los ratones. Esta plataforma absorbente de toxina representa un nuevo paradigma en tratamientos tanto de nanopartículas terapéuticas como de antitoxina. Al contrario que las estrategias convencionales de escape fagocitario que impiden las interacciones entre proteínas mediante recubrimientos hidrófilos, las nanoesponjas cubiertas con membrana de GR pueden interactuar con proteínas tóxicas y funcionar como toxina señuelo in vivo. Y al contrario que otras plataformas antitoxina específicas de estructura, las nanoesponjas se refieren a un mecanismo común de alteración de las membranas y presentan el potencial de tratar una diversidad de lesiones y enfermedades inducidas por las TFP. Más importante, la plataforma plantea poco riesgo de complicaciones tras la administración tópica o sistémica, ya que está comprendida enteramente de materiales biocompatibles y biodegradables. El núcleo polimérico también podría sustituirse por otras cargas terapéuticas para crear tratamientos multimodales contra enfermedades infecciosas. Debido a que las TFP son las toxinas más comunes, la plataforma nanoesponja presenta enormes implicaciones terapéuticas en el contexto clínico.

Capacidad de absorción experimental de las nanoesponjas

Densidad de PLGA: $\rho = 1,2 \text{ g/ml}$

5 Radio del núcleo de polímero: $r = 35 \text{ nm}$

Masa de las nanoesponjas: $M_{ns} = \rho \times \frac{4}{3} \pi r^3 = 2,2 \times 10^{-16} \text{ g}$ Por partícula = $1,30 \times 10^8 \text{ g por mol}$

Masa de α -toxina: $M_t = 34.000 \text{ g por mol}$

10

Basado en la observación de que $9 \mu\text{g}$ de toxina pueden ser totalmente absorbidos por $200 \mu\text{g}$ de NP:

$200 \mu\text{g}$ de nanoesponjas $\sim 1,5 \times 10^{-12}$ moles

$9 \mu\text{g}$ de α -toxina $\sim 2,6 \times 10^{-10}$ moles

15

Toxina: NP=173:1

Capacidad de absorción teórica de las nanoesponjas

Diámetro medio de las nanoesponjas: $r_{ns} = 42,5 \text{ nm}$

20

Superficie de nanoesponja: $A_{ns} = 4\pi r_{ns}^2 = 22697 \text{ nm}^2$

Se suponen anillos heptaméricos totalmente empaquetados de la α -toxina sobre las nanoesponjas.

25

Basado en un diámetro exterior de 10 nm de un anillo de α -toxina oligomerizada (1), la superficie de proyección

del anillo es: $A_{\text{heptámero toxina}} = \pi r_{\text{anillo}}^2 = 78,5 \text{ nm}^2$ Número de anillos oligomerizadas por nanoesponja = $22697/78,5 = 289$ anillos heptaméricos monómeros de α -toxina por nanoesponja = $289 \times 7 = 2024$

Materiales y métodos:

30

Preparación de nanoesponjas de toxina

Se sintetizaron partículas de nanoesponja tal como se ha informado anteriormente (2). Se centrifugó sangre completa recogida de ratones ICR macho e 6 semanas de edad (Charles River Laboratories) a $800 \times g$ durante 5 min con el fin de aislar los GR. A continuación, los GR se sometieron a tratamiento hipotónico y los fantasmas de GR se recolectaron mediante centrifugación a $800 \times g$ durante 5 min. Los fantasmas resultantes se extruyeron en serie a través de membranas porosas de policarbonato de 400 nm y 100 nm utilizando un miniextrusor (Avanti Polar Lipids). Se prepararon concurrentemente núcleos poliméricos de PLGA utilizando $0,67 \text{ dl/g}$ de poli(DL-láctico-co-glicólico) 50:50 con terminación carboxi (polímeros absorbibles LACTEL) en un procedimiento de desplazamiento de solvente. Se disolvió el PLGA en acetonitrilo a una concentración de 1 mg/ml . Para preparar 1 mg de nanopartículas, se añadió gota a gota 1 ml de la solución de PLGA a 3 ml de agua. La mezcla resultante se agitó al aire libre durante 2 h y se concentró utilizando filtros centrífugos Amicon Ultra-4 de corte de peso molecular de 10 kDa (Millipore). Las nanoesponjas de GR finales se sintetizaron mediante extrusión de las nanopartículas de PLGA con vesículas preparadas a partir de sangre recién extraída (1 mg de PLGA por cada 1 ml de sangre) a través de una membrana de policarbonato de 100 nm . Se utilizó la purga con nitrógeno para concentrar las nanopartículas según resultase necesario. El peso de polímero PLGA se utilizó para todos los valores de masas siguientes citados para las nanoesponjas. El tamaño de las nanoesponjas se determinó a partir de tres mediciones repetidas de dispersión dinámica de la luz utilizando un aparato Malvern ZEN 3600 Zetasizer, que mostró un tamaño medio de 85 nm .

50

Microscopía electrónica de transmisión de las nanoesponjas de toxina

Se incubaron $100 \mu\text{g}$ de nanoesponjas de GR con $3 \mu\text{g}$ de α -toxina de *Staphylococcus aureus* (Sigma Aldrich) durante 15 min . Se depositó una gota de solución de nanopartículas sobre una rejilla recubierta de carbón sobre la que previamente se había realizado una descarga luminiscente, a una concentración de nanoesponjas de $4 \mu\text{g/ml}$. Un minuto después del depósito la gota se lavó con 10 gotas de agua destilada y se tiñó con acetato de uranilo al 1% . Se obtuvieron imágenes de la muestra bajo un microscopio FEI Sphera a 200 kV .

55

Preparación de nanopartículas de PLGA PEGiladas, liposomas PEGilados y vesículas de membrana de GR

60

Las nanopartículas PEGiladas se prepararon siguiendo un método de nanoprecipitación. Brevemente, 1 mg de copolímero dibloque PEG-PLGA se disolvió en 1 ml de acetonitrilo y se añadió a un vial que contenía 3 ml de agua bajo agitación constante. A continuación, se evaporó el solvente orgánico en la campana durante 2 h .

Seguidamente, las soluciones de NP se lavaron tres veces utilizando un filtro de centrifuga Amicon Ultra-4 (Millipore) con un valor de corte de peso molecular de 10 kDa. Los liposomas PEGilados se prepararon mediante extrusión mecánica. Brevemente, 1 mg de PC de huevo y 200 µg de DSPE-PEG-carboxi (Avanti Polar Lipids) se disolvieron en 1 ml de cloroformo. A continuación, se evaporó el solvente orgánico para formar una película de lípido seca. La película de lípido se rehidrató con 1 ml de PBS, seguido de la agitación con vórtex durante 1 min y la sonicación durante 3 min en un baño sonicador FS30D (Fisher Scientific). La formulación seguidamente se extruyó a través de una membrana de policarbonato de 100 nm de tamaño de poro 11 veces con el fin de formar liposomas de distribución estrecha. Las vesículas de membrana de GR se prepararon siguiendo los protocolos de purificación de GR y extrusión de membranas tal como se han descrito para la preparación de nanoesponjas. Se obtuvo el tamaño de las nanoformulaciones a partir de tres mediciones repetidas utilizando dispersión dinámica de la luz, que mostró un tamaño medio de 90, 105 y 120 nm para las nanopartículas de PLGA PEGiladas, los liposomas PEGilados y las vesículas de membrana de GR, respectivamente.

Ensayo de neutralización competitiva de nanoesponjas de GR

Se incubaron 3 µg de α-toxina durante 30 min con 200 µl de soluciones de PBS que contenían 1 mg/ml de nanoesponjas de GR, nanopartículas de PLGA PEGiladas, liposomas PEGilados y vesículas de membrana de GR. Se preparó un control negativo con 9 µg de α-toxina en PBS. A continuación, se incubaron las soluciones durante 30 min adicionales con 1,8 ml de GR de ratón purificados al 5%. Tras la incubación, cada muestra se pelletizó a 14.000 rpm en una centrifuga Beckman Coulter Microfuge® 22R durante 10 min. Se analizó la absorbancia de la hemoglobina en el sobrenadante a 540 nm utilizando un lector de multiplacas Tecan Infinite M200 para el ensayo del grado de lisis de GR. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Estudio de unión de nanoesponjas de GR

Se incubaron 9 µg de α-toxina durante 30 min con 200 µl de soluciones de PBS que contenían 1 mg/ml de nanoesponjas de GR, nanopartículas de PLGA PEGiladas, liposomas PEGilados y vesículas de membrana de GR. Tras la incubación, las muestras se filtraron a través de una columna de exclusión por tamaño Sepharose® CL-4B para eliminar la toxina no unida. A continuación, las muestras se liofilizaron y se prepararon en tampón para muestras SDS (Invitrogen). Se prepararon 9 µg de α-toxina pura junto con las muestras filtradas. Las muestras preparadas se separaron en un minigel de 10 pocillos Bis-Tris al 4-12% en tampón de migración MOPS utilizando un sistema de electroforesis Novex® XCell SureLock (Invitrogen). Las muestras se analizaron a 200 V durante 50 min y el gel de poliacrilamida resultante se tiñó en SimplyBlue (Invitrogen) durante la noche para la visualización. Para cuantificar la retención de toxina, se analizó la intensidad de la banda de 34 kDa utilizando ImageJ con estándar de toxina preparado a partir de 0,3, 1, 3 y 9 µg de α-toxina pura.

Estudio de titulación de α-toxina

Se incubaron 200 µl de nanoesponjas 1 mg/ml en PBS durante 30 min con 30, 9, 3,6, 1,2, 0,6 y 0,3 µg de α-toxina. A modo de grupo de control, también se prepararon soluciones que contenían las mismas concentraciones de α-toxina en ausencia de las nanoesponjas. A continuación, la muestra y las soluciones de control se incubaron con 1,8 ml de GR de ratón al 5% en PBS durante 30 min. Cada muestra se pelletizó a 14.000 rpm durante 10 min. Se analizó la absorbancia de la hemoglobina en el sobrenadante a 540 nm para someter a ensayo el grado de lisis de los GR. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Estudio de titulación de nanoesponjas

Se prepararon soluciones de PBS que contenían diversas cantidades de nanoesponjas de toxina: 200, 60, 20, 6 y 2 µg. Cada solución de nanoesponjas se mezcló con 9 µg de α-toxina en PBS y se diluyó hasta un volumen final de 200 µl. Tras 30 min de incubación, se añadieron las soluciones a 1,8 ml de GR de ratón al 5% en PBS y se incubaron durante 30 min. A continuación, la solución se pelletizó a 14.000 rpm durante 10 min. Se analizó la absorbancia de la hemoglobina en el sobrenadante a 540 nm para someter a ensayo el grado de lisis de los GR. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Incorporación celular de las nanoesponjas de GR

Con el fin de examinar los materiales membranales de las nanoesponjas y de las vesículas de membrana de GR tras la incorporación celular, se añadieron 10 µg de DMPE-rodamina (Avanti Polar Lipids) a los fantasmas de GR derivados de 1 ml de sangre completa antes de la extrusión mecánica en vesículas de membrana. Las vesículas de membrana de GR cargadas de pigmento resultantes se utilizaron para preparar las nanoesponjas. Las nanoesponjas fluorescentes y vesículas de membrana se incubaron durante 1 hora con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (ATCC nº CRL-1730) a una concentración de 300 µg/ml en medio 199 con BSS de Hank con L-glutamina, HEPES y 1,4 g/l de NaHCO₃ (Lonza) complementado con 100 U/ml de penicilina con 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen) y 50 µg/ml de complemento de crecimiento de células endoteliales (Biomedical Technologies, Inc.). A continuación, se aspiró el medio y las células se incubaron en medio fresco durante 1 h. Tras el segundo periodo de incubación, las células se lavaron con PBS, se fijaron con formalina al

10% (Millipore) y se montaron con Vectashield® que contenía DAPI (Invitrogen). Se obtuvieron imágenes de las células utilizando un objetivo de inmersión en aceite 60X en un microscopio de fluorescencia de barrido con desconvolución Applied Precision DeltaVision.

5 Neutralización de toxina por vía subcutánea

Las nanoesponjas de GR se incubaron con α -toxina a una concentración final de 0,67 mg/ml de nanoesponjas y 12 μ g/ml de α -toxina en PBS durante 15 min. A continuación, se inyectó un volumen de 150 μ l de la mezcla por vía subcutánea en la región de flanco de ratones desnudos nu/nu hembra de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories). El día 3 después de las inyecciones se obtuvieron imágenes de los ratones. Se cortaron muestras de piel y músculos de 5 μ m y se tiñeron utilizando H-E para la histología.

15 Neutralización de toxina por vía sistémica

Se prepararon nanoesponjas de GR a una concentración de 20 mg/ml y α -toxina a una concentración de 60 μ g/ml previamente en agua destilada. Para los estudios de preinoculación, en ratones ICR macho de 6 semanas de edad se inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola 80 mg/kg (dosis para peso corporal) de nanoesponjas, seguido de una inyección de 75 μ g/kg de α -toxina 2 min después. Para los estudios de posinoculación, en primer lugar en ratones ICR macho de 6 semanas de edad se inyectaron 75 μ g/kg de α -toxina seguido de 80 mg/kg de nanoesponjas 2 min después. En los controles se inyectaron 75 μ g/kg de solución de α -toxina únicamente. El tamaño muestral de cada grupo fue de 9.

- 25 1. A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* 3, 541 (Sep, 2007).
2. D. G. Beghini et al., Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon* 44, 141 (Aug, 2004).
- 30 3. Z. Chen et al., Potent neutralization of anthrax edema toxin by a humanized monoclonal antibody that competes with calmodulin for edema factor binding. *Proc Natl Acad Sci US A* 106, 13487 (Aug 11, 2009).
- 35 4. W. W. Kum, A. W. Chow, Inhibition of staphylococcal enterotoxin A-induced superantigenic and lethal activities by a monoclonal antibody to toxic shock syndrome toxin-1. *J Infect Dis* 183, 1739 (Jun 15, 2001).
- 40 5. C. C. McCormick, A. R. Caballero, C. L. Balzli, A. Tang, R. J. O'Callaghan, Chemical inhibition of alpha-toxin, a key corneal virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2848 (Jun, 2009).
- 45 6. D. T. Hung, E. A. Shakhnovich, E. Pierson, J. J. Mekalanos, Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670 (Oct 28, 2005).
7. Y. Hoshino et al., The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 33 (Jan 3, 2012).
8. Y. Hoshino et al., Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. *J Am Chem Soc* 132, 6644 (May 19, 2010).
- 50 9. R. J. Gilbert, Pore-forming toxins. *Cell Mol Life Sci* 59, 832 (May, 2002).
10. C. J. Rosado et al., The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol* 10, 1765 (Sep, 2008).
- 55 11. J. Bubeck Wardenburg, O. Schneewind, Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *J Exp Med* 205, 287 (Feb 18, 2008).
12. M. Shoham, Antivirulence agents against MRSA. *Future Med Chem* 3, 775 (May, 2011).
- 60 13. P. O'Hanley, G. Lalonde, G. Ji, Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of pillated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infect Immun* 59, 1153 (Mar, 1991).
- 65 14. B. T. Edelson, E. R. Unanue, Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity* 14, 503 (May, 2001).
15. B. T. Edelson, P. Cossart, E. R. Unanue, Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to

Listeria infection. J Immunol 163, 4087 (Oct 15, 1999).

16. A. Nakouzi, J. Rivera, R. F. Rest, A. Casadevall, Passive administration of monoclonal antibodies to anthrolysin O prolong survival in mice lethally infected with Bacillus anthracis. BMC Microbiol 8, 159 (2008).

17. J. E. Alexander et al., Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 62, 5683 (Dec, 1994).

18. L. A. Kirkham et al., Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. Infect Immun 74, 586 (Jan, 2006).

19. I. Andreeva-Kovalevskaya Zh, A. S. Solonin, E. V. Sineva, V. I. Ternovsky, Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions. Biochemistry (Mosc) 73, 1473 (Dec, 2008).

20. G. Ma, Q. Cheng, Vesicular polydiacetylene sensor for colorimetric signaling of bacterial pore-forming toxin. Langmuir 21, 6123 (Jul 5, 2005).

21. D. Pornpattananangkul et al., Bacterial toxin-triggered drug release from gold nanoparticle-stabilized liposomes for the treatment of bacterial infection. J Am Chem Soc 133, 4132 (Mar 23, 2011).

22. D. Branton et al., The potential and challenges of nanopore sequencing. Nat Biotechnol 26, 1146 (Oct, 2008).

23. C. M. Hu, L. Zhang, S. Aryal, C. Cheung, R. H. Fang, Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 10980 (Jul 5, 2011).

24. A. S. Klainer, M. A. Madoff, L. Z. Cooper, L. Weinstein, Staphylococcal Alpha-Hemolysin: Detection on the Erythrocyte Membrane by Immunofluorescence. Science 145, 714 (Aug 14, 1964).

25. J. Chalmeau, N. Monina, J. Shin, C. Vieu, V. Noireaux, alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. Biochim Biophys Acta 1808, 271 (Jan, 2011).

26. M. Moorjani et al., Nanoerythrocytes, a new derivative of erythrocyte ghost II: identification of the mechanism of action. Anticancer Res 16, 2831 (Sep-Oct, 1996).

27. S. Vandana, M. Raje, M. V. Krishnasastri, The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of Staphylococcus aureus. J Biol Chem 272, 24858 (Oct 3, 1997).

28. A. Valeva et al., J Biol Chem 276, 14835 (May 4, 2001).

29. C. M. Hu, L. Zhang, S. Aryal, C. Cheung, R. H. Fang, Proc Natl Acad Sci U S A 108, 10980 (Jul 5, 2011).

Ejemplo 5

Nanopartículas recubiertas con membrana celular para la inmunización activa de toxinas

Actualmente, el método principal en la vacunación de toxinas es mediante la utilización de toxinas desnaturalizadas. Sin embargo, dicho método puede resultar ineficaz para neutralizar la virulencia de la toxina y podría alterar las estructuras nativas que son necesarias para la antigenicidad de las proteínas toxinas. Se han administrado toxinas manipuladas genéticamente con toxicidad reducida para la vacunación con toxinas. Sin embargo, estas formulaciones necesitan personalizarse para especies de toxina específicas y son caras de fabricar.

Una partícula neutralizadora de toxina para una inmunización segura con toxina es única y no ha sido descrita anteriormente. Los enfoques existentes de inmunización de toxina implican la desnaturalización mediante calor o compuestos químicos, los cuales pueden influir sobre la inmunogenicidad de las toxinas, o contrapartidas proteínas no virulentas manipuladas, que pueden resultar costosas y engorrosas. El compromiso entre reducir la toxicidad de la toxina y conservar la antigenicidad de la vacuna ha supuesto un reto significativo para la inmunización con toxinas. La presente invención proporciona una ventaja principal respecto a la técnica anterior, ya que neutraliza la virulencia de la toxina sin alterar sus estructuras nativas. Resulta fácil de preparar y es aplicable a un gran número de especies de toxina.

Las nanopartículas recubiertas con membranas celulares se utilizan como plataforma para administrar antígenos de interés para la inmunización activa. Se ha demostrado que la partícula recubierta con membrana bicapa

puede absorber y destoxificar toxinas bacterianas. Estas proteínas unidas a partícula neutralizadas han sido despojadas de su virulencia y sin embargo conservan su inmunogenicidad y se administran in vivo para inducir una respuesta inmunológica. Esta estrategia se utiliza para pasivar toxinas para la inmunización activa, con la que el sujeto adquiere las defensas contra la toxina diana inicial (figura 23). La técnica trata un amplio abanico de infecciones y enfermedades, incluyendo, aunque sin limitación, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. El tamaño submicrométrico de las partículas permite que la plataforma resulta fácilmente endocitada por las células presentadoras de antígenos.

Las toxinas formadoras de poro, tales como la alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* causan daños celulares al agujerear las membranas celulares. La nanoesponja de toxina descrita en la presente memoria consiste en un núcleo polimérico que se encuentra recubierto por los materiales membranales de los glóbulos rojos. Las membranas sobre las nanopartículas interactúan con las toxinas de manera similar a las células reales. Una vez las toxinas se adhieren a las nanoesponjas, se encuentran bloqueadas en el interior por la estructura estable y, por lo tanto, no pueden provocar mayores daños (figura 24). Las toxinas neutralizadas conservan su estructura y conformación naturales para inducir inmunidad adaptativa contra la toxina diana.

El presente ejemplo proporciona nanopartículas recubiertas con membrana celular para la inmunización activa de toxinas. Mediante la utilización de nanopartículas preparadas a partir de glóbulos rojos de ratones y polímeros PLGA, en el contexto de la presente invención se han neutralizado con éxito las alfa-hemolisinas de *S. aureus* y las han administrado por vía subcutánea en ratones sin provocar ningún daño observable (figura 25): Tras 3 cursos de inoculaciones con la formulación de partículas/toxina, los ratones muestran un título sérico contra la toxina diana al mismo nivel que los inoculados con toxina desnaturalizada por calor (figura 26). De esta manera, en el contexto de la presente invención se ha demostrado que el suero de los ratones inmunizados con partículas/toxina podían inhibir la actividad hemolítica de las alfa-hemolisinas (figura 27). En un reto de toxina en el que en un grupo de 10 ratones se inyectó por vía intravenosa una dosis letal de toxinas, los ratones inmunizados con partículas/toxina mostraron una supervivencia de 100%, mientras que ninguno de los ratones no inmunizados sobrevivió más allá de la marca de las 6 h (figura 28).

Las toxinas formadoras de poro son los factores de virulencia clave en muchas enfermedades infecciosas importantes, incluyendo, aunque sin limitación, la infección por estafilococos, la neumonía, el ántrax, la gangrena gaseosa y la faringitis estreptocócica. La invención puede utilizarse como vacunación con toxinas para tratar o prevenir dichas infecciones.

Referencias:

Toxinas desnaturalizadas para la inmunización

1. Eaton M., "Chemical Modification of Purified Diphtheria Toxin." *The Journal of Immunology*. 1937 (33): 419-436.
2. Goshi K, Cluff L, Johnson J. "Studies on the Pathogenesis of Staphylococcal Infection." *The Journal of Experimental Medicine*. 1961, 113(2): 259-270.

Manipulación de toxinas inactivas para la inmunización

1. Heveker N, Kiessig ST, Glaser R, Hungerer KD, Von Baehr R., "Anti-Alpha-Hemolysin Monoclonal Antibodies Mediate Protection against *Staphylococcus aureus* Pneumonia." *Infection and Immunity*. 2009, 77(7):2712-2718.
2. Wardenburg B, Schneewind O., "Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia." *The Journal of Experimental Medicine*. 2008, 205(2): 287-294.

La descripción detallada proporcionada anteriormente se proporciona con el fin de ayudar al experto en la materia en la práctica de la presente invención.

Tabla 1 - Cánceres y tumores ejemplares

Tumor de Ackerman
adenocarcinoide, maligno, apendicular
Variante de adenocarcinoma, cáncer gástrico
Adenocarcinoma, productor de alfa-fetoproteína, esofágico
Adenocarcinoma, apocrino
Adenocarcinoma, apendicular
Adenocarcinoma, glándula de Bartolino
Adenocarcinoma, vejiga

Adenocarcinoma, células claras
 Adenocarcinoma, coloide
 Adenocarcinoma, tipo ductal
 Adenocarcinoma, ecrino
 Adenocarcinoma, endometrioide primario, en colorrectal
 endometriosis
 Adenocarcinoma, esófago
 Adenocarcinoma, conducto de Falopio
 Adenocarcinoma, pulmonar fetal
 Adenocarcinoma, vesícula biliar
 Adenocarcinoma, hepatoide
 Adenocarcinoma, in situ, cuello uterino
 Adenocarcinoma, intra-extrahepático, conductos biliares
 Adenocarcinoma, glándula lacrimal
 Adenocarcinoma, intestino grueso
 Adenocarcinoma, grado bajo, saco endolinfático extraóseo
 Adenocarcinoma, mucinoso
 Adenocarcinoma, mucinoso, próstata
 Adenocarcinoma, mucinoso, estómago
 Adenocarcinoma, oncocítico
 Adenocarcinoma, pancreático
 Adenocarcinoma, papilar, vejiga
 Adenocarcinoma, pleomórfico
 Adenocarcinoma, polimorfo de grado bajo
 Adenocarcinoma, yeyuno proximal
 Adenocarcinoma, rete testis
 Adenocarcinoma, intestino delgado
 Adenocarcinoma, timo
 Adenocarcinoma, sitio primario desconocido
 Adenocarcinoma, uracal
 Adenocarcinoma, uretral
 Adenocarcinoma, vaginal
 Adenomioepitelioma, maligno, mamario
 Adenosarcoma, mülleriano
 Síndrome adrenogenital/tumor testicular
 Ameloblastoma, desmoplásico
 Ameloblastoma, maligno
 Amiloide
 Angioblastoma, células gigantes
 Angioendotelioma, maligno, papilar endovascular
 Angioendotelioma, maligno
 Angiomixoma, maligno, agresivo, escroto
 Angiomixoma, maligno, agresivo, escroto
 angiosarcoma
 angiosarcoma, cardíaco
 Angiosarcoma, arteria pulmonar
 Angiosarcoma, Wilson-Jones
 Tumor de Askin
 Astroblastoma
 Neoplasma astrocítico
 Astrocitoma, anaplásico
 Astrocitoma, gemistocítico
 Astrocitoma, pilocítico
 Astrocitoma, glioma talámico
 Blastoma, pleuropulmonar (PPB)
 Blastoma, pulmonar
 Tumor borderline
 Tumor borderline, maligno, ovario
 Tumor de Buschke-Löwenstein, condiloma gigante
 Carcinamitosis, peritoneal
 Carcinoide, maligno
 Carcinoide, maligno, atípico
 Carcinoide, maligno, broncopulmonar, atípico
 Carcinoide, maligno, broncopulmonar, típico
 Carcinoide, maligno, colorrectal
 Carcinoide, maligno, gástrico

Carcinoide, maligno, gastrointestinal, apéndice
 Carcinoide, maligno, célula caliciforme
 Carcinoide, maligno, pulmón
 Carcinoide, maligno, pulmonar
 Carcinoide, maligno, rectal
 Carcinoide, maligno, renal
 Carcinoide, maligno, intestino delgado
 Carcinoide, maligno, tímico
 Carcinoide, células acinares (ACC)
 Carcinoma, células acínicas
 Carcinoma, basal adenoide, cuello uterino
 Carcinoma, quístico adenoide (AdCC)
 Carcinoma, quístico adenoide, mama (ACCB)
 Carcinoma, quístico adenoide, mama, metastásico (ACC-M)
 Carcinoma, adenoescamoso
 Carcinoma, adenoescamoso, hígado
 Carcinoma, adenoescamoso, pancreático
 Carcinoma, adrenocortical
 Carcinoma, ameloblástico
 Carcinoma, anal
 Carcinoma, anaplásico
 Carcinoma, anaplásico, tímico
 Carcinoma, anaplásico, tiroides
 Carcinoma, apocrino
 Carcinoma, células basales, perianal
 Carcinoma, células basales, vulva
 Carcinoma, células escamosas basaloides, esofágico
 Carcinoma, células escamosas basaloides, NOS
 Carcinoma, basaloide, pulmón
 Carcinoma, conducto biliar
 Carcinoma, tracto biliar
 Carcinoma, broncoalveolar (BAC)
 Carcinoma, broncogénico, células pequeñas no diferenciadas
 Carcinoma, plexo coroide
 Carcinoma, células ciliadas
 Carcinoma, células claras, vejiga
 Carcinoma, células claras, ecrina
 Carcinoma, células claras, odontogénico
 Carcinoma, células claras, tímico
 Carcinoma, conductos colectores (CDC)
 Carcinoma, conductos colectores, riñón
 Carcinoma, cribiforme
 Carcinoma, cribiforme, mama
 Carcinoma, quístico
 Carcinoma, duodenal
 Carcinoma, epitelial-mioepitelial (EMC)
 Carcinoma, vesícula biliar
 Carcinoma, células gigantes
 Carcinoma, hepatocelular
 Carcinoma, células de Hurthle
 Carcinoma, células de Hurthle, tiroides
 Carcinoma, insular
 Carcinoma, insular, tiroides
 Carcinoma, células de los islotes
 Carcinoma, células grandes, neuroendocrino (LCNEC)
 Carcinoma, tipo linfopitelioma, tímico
 Carcinoma, mama, masculino
 Carcinoma, tiroides medular
 Carcinoma, meibomiano
 Carcinoide, células de Merkel (MCC)
 Carcinoma, metaplásico, mama
 Carcinoma, anexial microquístico
 Carcinoma, acinar mixto, endocrino
 Carcinoma, moderadamente diferenciado, neuroendocrino
 Carcinoma, mucinoso, broncoalveolar, pulmón
 Carcinoma, mucinoso, ecrino

Carcinoma, mucoepidermoide
 Carcinoma, mucoepidermoide, bronquio
 Carcinoma, nasofaríngeo/caucásico (NPC)
 Carcinoma, neuroendocrino
 Carcinoma, neuroendocrino, pulmón
 Carcinoma, células no pequeñas con características neuroendocrinas, pulmón
 Carcinoma, odontogénico
 Carcinoma, papilar
 Carcinoma, papilar, mama
 Carcinoma, paratiroides
 Carcinoma, células parietales
 Carcinoma, peneano
 Carcinoma, pilomatricial
 Carcinoma, pituitario
 Carcinoma, urotelial plasmacitoide, vejiga
 Carcinoma, pobremente diferenciado, neuroendocrino (PDNEC)
 Carcinoma, intraóseo primario
 Carcinoma, peritoneal primario, extraovárico (EOPCC)
 Carcinoma, células renales (RCC), pobremente diferenciado
 Carcinoma, células renales (RCC), cromofóbico (ChC)
 Carcinoma, células renales (RCC), células claras (CCC)
 Carcinoma, células renales (RCC), conducto colector (CDC)
 Carcinoma, células renales (RCC), papilar (PC)
 Carcinoma, células renales (RCC), sarcomatoide
 Carcinoma, sarcomatoide, colon
 Carcinoma, sarcomatoide, tímico
 Carcinoma, sebáceo
 Carcinoma, ovárico seroso, papilar (PsOC)
 Carcinoma, células en anillo de sello
 Carcinoma, células pequeñas
 Carcinoma, células pequeñas no diferenciado, próstata
 Carcinoma, células pequeñas no diferenciado, próstata (SCUUP)
 Carcinoma, células pequeñas, neuroendocrino anorrectal
 Carcinoma, células pequeñas, colorrectal
 Carcinoma, células pequeñas, esofágico
 Carcinoma, células pequeñas, extrapulmonar
 Carcinoma, células pequeñas, tracto gastrointestinal
 Carcinoma, células pequeñas, neuroendocrino (células de avena) (SCNC)
 Carcinoma, células pequeñas, pancreático
 Carcinoma, células pequeñas, renal
 Carcinoma, células pequeñas, estómago
 Carcinoma, células pequeñas, tímico
 Carcinoma, intestino delgado
 Carcinoma, células escamosas, quiste ductal anexial
 Carcinoma, células escamosas, atípico
 Carcinoma, células escamosas, mama
 Carcinoma, células escamosas, pagetoide difuso, esófago
 Carcinoma, células escamosas, esofágico
 Carcinoma, células escamosas, queratinizante, tímico (KTSC)
 Carcinoma, células escamosas, laríngeo
 Carcinoma, células escamosas, tipo linfoepitelioma
 Carcinoma, células escamosas, nasofaringe
 Carcinoma, células escamosas, no queratinizante
 Carcinoma, células escamosas, cavidad oral
 Carcinoma, células escamosas, ovárico
 Carcinoma, células escamosas, estómago
 Carcinoma, células escamosas, subungual (SCC)
 Carcinoma, células escamosas, tímico
 carcinoma, células escamosas, quiste del conducto tirogloso (TGDC)
 Carcinoma, células escamosas, tiroides
 Carcinoma, células escamosas, uretra
 Carcinoma, células escamosas, vagina
 Carcinoma, células escamosas, vulvar
 Carcinoma, conducto terminal
 Carcinoma, testicular
 Carcinoma, células de transición

Carcinoma, células de transición, próstata
 Carcinoma, triquilemal
 Carcinoma, tubal
 Carcinoma, tubular, mama
 Carcinoma, no diferenciado, tipo nasofaríngeo (UCNT)
 Carcinoma, no diferenciado, nasofaríngeo sinonasal primario
 Carcinoma, no diferenciado, sinonasal (SNUC)
 Carcinoma, no diferenciado, tímico
 Carcinoma, no diferenciado, con estroma linfoide
 Carcinoma, vaginal
 Carcinoma, verrucoso
 Carcinoma, con metaplasia de las células del huso, mama
 Carcinoma, con metaplasia, variante ostocondroide, mama
 Carcinoma, con metaplasia sarcomatosa, mama
 Carcinoma, bien diferenciado, neuroendocrino (WDNEC)
 Carcinoma, bien diferenciado, tímico (WDTTC)
 Carcinosarcoma
 Carcinosarcoma, uterino
 Tumor del cartílago
 Tumor cartilaginoso, laringe
 Quemodectoma, maligno
 Cloroma
 Colangio-carcinoma
 Colangitis, esclerosante primario
 Condroblastoma
 Siringoma condroide, maligno (MCS)
 Condroma, maligno, pulmonar (en tríada de Carney)
 Condrosarcoma
 Condrosarcoma, sinovial acral
 Condrosarcoma, clásico, intradural primario
 Condrosarcoma, células claras
 Condrosarcoma, células claras, laringe
 Condrosarcoma, dural
 Condrosarcoma, intracraneal
 Condrosarcoma, mesenquimal
 Condrosarcoma, mixoide, extraesquelético
 Cordoma
 Cordoma, clivus
 Cordoma, hereditario
 Cordoma, cavidad intracraneal
 Cordoma, NOS
 Cordoma, periférico
 Cordoma, sacro
 Cordoma, base del cráneo
 Cordoma, vértebras
 Coriocarcinoma
 Coriocarcinoma, esófago
 Coriocarcinoma, gástrico
 Coriocarcinoma, ovario
 Coriocarcinoma, estómago
 Coriocarcinoma/masculino, primario, pulmonar
 Tumor maligno cutáneo
 Cilindroma, maligno
 Cilindroma, maligno, apocrino
 Cistoadenocarcinoma, células acinares
 Cistoadenocarcinoma, mucinoso
 Cistoadenocarcinoma, pancreático
 Cistoadenocarcinoma, seroso
 Tumor quístico-pseudopapilar/páncreas
 Cistosarcoma filoides, maligno, mama
 Cistosarcoma filoides
 Dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP)
 Dermatofibrosarcoma protuberante, variante fibrosarcomatosa
 Dermatofibrosarcoma protuberante, NOS
 Dermatofibrosarcoma protuberante, pigmentado
 Desmoplasia, células redondas pequeñas (DSRCT)

Tumor neuroepitelial disembrionárico (DNT)
 Disgerminoma
 Disgerminoma, ovárico
 Poroma ecrino, maligno
 Espiradenoma ecrino, maligno
 Ectomesenquimoma, maligno
 Emlanoma, maligno, placenta
 Tumor endocrino, pancreático
 Tumor del seno endodérmico
 Tumor endometriode, ovario
 Ependimoma
 Cáncer epitelial, ovárico (EOC)
 Tumor epitelial, apendicular
 Tumor epitelial, cavidad oral
 Epitelioma *cuniculatum*
 Eritroleucemia
 Estesioneuroblastoma
 Fibrosarcoma
 Histiocitoma fibroso, maligno
 Histiocitoma fibroso, maligno (MFH)
 Histiocitoma fibroso, maligno, angiomatoide
 Histiocitoma fibroso, maligno, intracerebral
 Histiocitoma fibroso, maligno, renal
 Tumor del tejido fibroso, maligno
 Tumor fibroso, solitario, maligno
 Fibroxantoma, atípico
 Tumor folicular
 Ganglioneuroblastoma
 Tumor nervioso autónomo gastrointestinal
 Tumor de células germinales
 Tumor de células germinales, intracraneal (GCT)
 Tumor de células germinales, ovárico
 Tumor de células germinales, testicular (GCTS)
 Germinoma (seminoma)
 Germinoma, pineal
 Tumor trofoblástico gestacional
 Tumor de células gigantes, no endocrino
 Glioblastoma multiforme, médula espinal
 Glioblastoma, células gigantes
 Glioma
 Glioma, nervio óptico
 Glomangiosarcoma
 Tumor glómico, maligno
 Síndrome del glucagonoma
 Tumor de células granulares, maligno
 Tumor de células granulares, maligno, laringe
 Tumor de células granulosa, ovario
 Tumor granuloso, células estromales
 Ginandroblastoma
 Hamartoma, mesenquimal, hígado (MHL)
 Hemangioendotelioma
 Hemangioendotelioma, epiteliode
 Hemangioendotelioma, células del huso
 Hemangioendotelioma, tiroide
 Hemangioendoteliomas, epiteliode, pulmonar (PEH)
 Hemangiopericitoma (HEPC)
 Hemangiosarcoma
 Hepatoblastoma
 Cáncer colorrectal no poliposis hereditario (HNPCC)
 Hidradenoma papilífero, maligno
 Histiocitoma
 Histiocitosis, maligna
 Enfermedad de Hodgkin
 Enfermedad de Hodgkin, vejiga
 Enfermedad de Hodgkin, sangre
 Enfermedad de Hodgkin, hueso

Enfermedad de Hodgkin, médula ósea
 Enfermedad de Hodgkin, mama
 Enfermedad de Hodgkin, sistema cardiovascular
 Enfermedad de Hodgkin, sistema nervioso central
 Enfermedad de Hodgkin, enfermedad del tejido conectivo
 Enfermedad de Hodgkin, sistema endocrino
 Enfermedad de Hodgkin, tracto gastrointestinal
 Enfermedad de Hodgkin, genitourinario
 Enfermedad de Hodgkin, cabeza y cuello
 Enfermedad de Hodgkin, riñón
 Enfermedad de Hodgkin, pulmón
 Enfermedad de Hodgkin, músculo
 Enfermedad de Hodgkin, sistema neurológico
 Enfermedad de Hodgkin, próstata
 Enfermedad de Hodgkin, sistema reproductor
 Enfermedad de Hodgkin, sistema respiratorio
 Enfermedad de Hodgkin, piel
 Enfermedad de Hodgkin, testículo
 Enfermedad de Hodgkin, timo
 Enfermedad de Hodgkin, tiroides
 Síndrome de hipocalemia y aclorhidria, bien diferenciado
 Tumor miofibroblástico inflamatorio (IMT)
 Tumor miofibroblástico inflamatorio (IMT), pulmonar
 Cáncer papilar insular, tiroides
 Insulinoma, maligno
 Tumor de las células de los islotes, no funcional
 Células de los islotes, pancreático
 Krukenberg
 Histiocitosis de las células de Langerhans (LCH)
 Leiomioblastoma
 Leiomiomatosis, intravenosa
 Leiomiosarcoma
 Leiomiosarcoma, adrenal
 Leiomiosarcoma, epitelioide, leiomiosarcoma gástrico, epitelioide gástrico
 Leiomiosarcoma, esófago
 Leiomiosarcoma, pulmón
 Leiomiosarcoma, cavidad oral
 Leiomiosarcoma, páncreas
 Leiomiosarcoma, hueso primario (PLMSB)
 Leiomiosarcoma, renal
 Leiomiosarcoma, perineal superficial
 Leiomiosarcoma, uterino
 Leiomiosarcoma, vulva
 Leucemia, eritroblástica aguda (FAB M6)
 Leucemia, linfocítica aguda (ALL)
 Leucemia, monocítica aguda
 Leucemia, mielóide aguda (AML)
 Leucemia, no linfocítica aguda (ANLL)
 Leucemia, no linfoblástica aguda
 Leucemia, no diferenciada aguda (AUL)
 Leucemia, de células T adulta
 Leucemia, basofílica
 Leucemia, sistema nervioso central
 Leucemia, linfocítica crónica (CLL)
 Leucemia, mielógena crónica (CML)
 Leucemia, cutis
 Leucemia, eosinofílica
 Leucemia, extramedular
 Leucemia, células pilosas (HCL)
 Leucemia, células de Hodgkin
 Leucemia, linfoblástica, células T, aguda (ALL)
 Leucemia, prolinfocítica, células T
 Leucemia, promielocítica
 Tumor de las células de Leydig (LCT)
 Lipoastrocitoma
 Lipoblastoma

Liposarcoma
 Liposarcoma, laringe
 Liposarcoma, mixoide
 Liposarcoma, pleomórfico
 Liposarcoma, mesentérico primario
 Liposarcoma, renal
 Liposarcoma, bien diferenciado
 Tumor de bajo potencial de malignidad, ovario (LMP)
 Linfoepitelioma, glándula parótida
 Linfoma, adrenal
 Linfoma, angiocéntico
 Linfoma, células grandes angiotrópicas
 Linfoma, células B
 Linfoma, células B, grado bajo, hígado
 Linfoma, células B, glándulas salivares
 Linfoma, vejiga
 Linfoma, hueso
 Linfoma, mama
 Linfoma, mama, tipo MALT
 Linfoma, de Burkitt
 Linfoma, sistema cardiovascular
 Linfoma, sistema nervioso central
 Linfoma, cuello uterino
 Linfoma, pared torácica
 Linfoma, tumor linfoide asociado a la mucosa colorrectal
 Linfoma, células B cutáneas
 Linfoma, células T cutáneas (CTCL)
 Linfoma, células grandes difusas
 Linfoma, duodenal
 Linfoma, endocrino
 Linfoma, esofágico
 Linfoma, folicular
 Linfoma, vesícula biliar
 Linfoma, tracto gastrointestinal
 Linfoma, tracto genital
 Linfoma, cabeza y cuello
 Linfoma, corazón
 Linfoma, hepatobiliar
 Linfoma, asociado al VIH
 Linfoma, intravascular
 Linfoma, positivo para Ki-1, anaplásico, células grandes
 Linfoma, riñón
 Linfoma, intestino grueso
 Linfoma, células grandes, anaplásico
 Linfoma, laringe
 Linfoma, pulmón
 Linfoma, linfoblástico (LBL)
 Linfoma, MALT
 Linfoma, células del manto
 Linfoma, mediterráneo
 Linfoma, músculo
 Linfoma, nasal
 Linfoma, sistema neurológico
 Linfoma, no de Hodgking (NHL)
 Linfoma, no de Hodgking, mama
 Linfoma, no de Hodgking, localización extranodal
 Linfoma, no de Hodgking, laringe
 Linfoma, no de Hodgking, pulmonar
 Linfoma, no de Hodgking, testículo
 Linfoma, ocular
 Linfoma, oral
 Linfoma, orbital
 Linfoma, ovario
 Linfoma, linfoma pancreático, páncreas
 Linfoma, seno paranasal
 Linfoma, peneano

Linfoma, sistema nervioso periférico
 Linfoma, faringe
 Linfoma, pituitaria
 Linfoma, mama, primario
 Linfoma, sistema nervioso central primario
 Linfoma, pulmón primario
 Linfoma, próstata
 Linfoma, pulmonar
 Linfoma, renal
 Linfoma, sistema respiratorio
 Linfoma, escroto
 Linfoma, piel
 Linfoma, intestino delgado
 Linfoma, intestino delgado
 Linfoma, tejido blando
 Linfoma, cordón espermático
 Linfoma, estómago
 Linfoma, células T (CTCL)
 Linfoma, testicular
 Linfoma, tiroides
 Linfoma, tráquea
 Linfoma, uréter
 Linfoma, uretra
 Linfoma, sistema urológico
 Linfoma, útero
 Linfomatosis, intravascular
 Tumor MALT
 Meduloblastoma
 Melanoma, adrenal
 Melanoma, amelanótico
 Melanoma, anal
 Melanoma, anorrectal
 Melanoma, árbol biliar
 Melanoma, vejiga
 Melanoma, cerebro
 Melanoma, mama
 Melanoma, sistema cardiopulmonar
 Melanoma, sistema nervioso central
 Melanoma, cuello uterino
 Melanoma, coroidal
 Melanoma, conjuntival
 Melanoma, desmoplásico
 Melanoma, endocrino
 Melanoma, esofágico
 Melanoma, vesícula biliar
 Melanoma, tracto gastrointestinal
 Melanoma, tracto genitourinario
 Melanoma, cabeza y cuello
 Melanoma, corazón
 Melanoma, intraocular
 Melanoma, intraoral
 Melanoma, riñón
 Melanoma, laringe
 Melanoma, leptomeníngeo
 Melanoma, pulmón
 Melanoma, mucosa nasal
 Melanoma, cavidad oral
 Melanoma, formador de osteoide/osteogénico
 Melanoma, ovario
 Melanoma, páncreas
 Melanoma, seno paranasal
 Melanoma, paratiroides
 Melanoma, pene
 Melanoma, pericardio
 Melanoma, pituitario
 Melanoma, placenta

Melanoma, próstata
 Melanoma, pulmonar
 Melanoma, recto
 Melanoma, pelvis renal
 Melanoma, seno nasal
 Melanoma, sistema esquelético
 Melanoma, intestino delgado
 Melanoma, intestino delgado
 Melanoma, médula espinal
 Melanoma, bazo
 Melanoma, estómago
 Melanoma, testículo
 Melanoma, tiroide
 Melanoma, uréter
 Melanoma, uretra
 Melanoma, útero
 Melanoma, vagina
 Melanoma, vulva
 Meningioma, maligno, anaplásico
 Meningioma, maligno, angioblástico
 Meningioma, maligno, atípico
 Meningioma, maligno, papilar
 Neoplasma mesenquimal, estromal
 Mesenquimoma
 Nefroma mesoblástico
 Mesotelioma, maligno
 Mesotelioma, maligno, pleura
 Mesotelioma, papilar
 Mesotelioma/túnica vaginal, maligno (MMTV)
 Microadenocarcinoma, pancreático
 Tumor de células mixtas, pancreático
 Tumor mesodérmico mixto (MMT)
 Tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)
 Tumor mülleriano, mixto maligno, conducto de Falopio
 Tumor mülleriano, mixto maligno, conducto uterino
 Mieloma, IgM
 Mioepitelioma
 Mioepitelioma, maligno, glándulas salivares
 Nefroblastoma
 Neuroblastoma
 Tumor neuroectodérmico, renal
 Tumor neuroendocrino, próstata
 Neurofibrosarcoma
 Hidradenoma nodular, maligno
 Oligodendroglioma
 Oligodendroglioma, anaplásico
 Oligodendroglioma, grado bajo
 Osteosarcoma
 Enfermedad de Paget, extramamario (EMPD)
 Enfermedad de Paget, mamario
 Pancreatoblastoma
 Paraganglioma, maligno
 Paraganglioma, maligno, extra-adrenal
 Paraganglioma, maligno, gangliocítico
 Paraganglioma, maligno, laríngeo
 Tumor de las vainas de los nervios periféricos, maligno (MPNST)
 Feocromocitoma, maligno
 Tumor filodes, maligno, mama
 Filomatrixoma, maligno
 Plasmacitoma, extramedular (EMP)
 Plasmacitoma, laríngeo
 Plasmacitoma, solitario
 Adenoma pleomórfico, maligno
 Xantastrocitoma pleomórfico (PXA)
 Tumor fibrohistiocítico plexiforme
 Poliembrioma

Tumor glótico polipoide
 Lesiones primarias, maligno, diafragma
 Lesiones malignas primarias, pared torácica
 Lesiones malignas primarias, pleura
 Seno nasal nasofaríngeo no diferenciado primario (PSNPC)
 Tumor neuroectodérmico primitivo (PNET)
 Tumor triquilemal proliferante, maligno
 Pseudomixoma peritonei, maligno (PMP)
 Raniofaringioma
 Tumor reticuloendotelial
 Hemangioendotelioma retiforme
 Retinoblastoma
 Retinoblastoma, trilateral
 Teratoma rabdoide, teratoide atípico AT/RT
 Tumor rabdoide, maligno
 Rabdomiosarcoma (RMS)
 Rabdomiosarcoma, orbital
 Rabdomiosarcoma, alveolar
 Rabdomiosarcoma, botrioide
 Rabdomiosarcoma, sistema nervioso central
 Rabdomiosarcoma, pared torácica
 Rabdomiosarcoma, paratesticular (PTR)
 Sarcoma, glándula prostática adulta
 Sarcoma, tejidos blandos adultos
 Sarcoma, tejidos blandos alveolares (ASPS)
 Sarcoma, vejiga
 Sarcoma, botrioides
 Sarcoma, sistema nervioso central
 Sarcoma, células claras, riñón
 Sarcoma, células claras, tejidos blandos
 Sarcoma, células dendríticas, folicular
 Sarcoma, estromal endometrial (ESS)
 Sarcoma, epitelioide
 Sarcoma, de Ewing (EWS)
 Sarcoma, de Ewing, extraóseo (EOE)
 Sarcoma, de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo
 Sarcoma, conducto de Falopio
 Sarcoma, fibromixioide
 Sarcoma, granulocítico
 Sarcoma, células reticulares interdigitantes
 Sarcoma, intracerebral
 Sarcoma, intracraneal
 Sarcoma, de Kaposi
 Sarcoma, de Kaposi, intraoral
 Sarcoma, riñón
 Sarcoma, mediastino
 Sarcoma, meníngeo
 Sarcoma, neurogénico
 Sarcoma, ovárico
 Sarcoma, pituitario
 Sarcoma, tejidos blandos pleomórficos
 Sarcoma, primario, pulmón
 Sarcoma, primario, pulmonar (PPS)
 Sarcoma, próstata
 Sarcoma, árbol arterial pulmonar
 Sarcoma, renal
 Sarcoma, árbol respiratorio
 Sarcoma, tejidos blandos
 Sarcoma, estromal, gastrointestinal (GIST)
 Sarcoma, estromal, ovárico
 Sarcoma, sinovial
 Sarcoma, sinovial, intraarticular
 Sarcoma, sinovial, pulmón
 Sarcoma, verdadero
 Sarcoma, uterino
 Sarcoma, vaginal

Sarcoma, vulvar
 Sarcomatosis, meníngea
 Metaplasia sarcomatosa
 Schwanoma, maligno
 Schwanoma, maligno, celular, piel
 Schwanoma, maligno, epitelióide
 Schwanoma, maligno, esofágico
 Schwanoma, maligno, nos
 Tumor de las células de Sertoli, células grandes, calcificante
 Tumor de células de Sertoli-Leydig (SLCT)
 Cáncer de células pequeñas, cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC)
 Tumor sólido-pseudopapilar, páncreas
 Somatostinoma
 Tumor de las células del huso
 Tumor epitelial del huso con elementos de tipo tímico
 Espiradenocilindroma, riñón
 Neoplasma escamoso, papilar
 Tumor de células esteroideas
 Síndrome de Stewart-Treves
 Tumor de células estromales, cordón sexual
 Células estromales, testicular
 Luteoma estromal
 Miosis estromal, endolinfático (ESM)
 Tumor estromal, colorrectal
 Tumor estromal, gastrointestinal (GIST)
 Tumor estromal, gonadal (cordón sexual) (GSTS)
 Tumor estromal, ovario
 Tumor estromal, intestino delgado
Struma ovarii
 Teratocarcinosarcoma, seno nasal (SNTCS)
 Teratoma, inmaduro
 Teratoma, espinal intramedular
 Teratoma, maduro
 Teratoma, pericardio
 Teratoma, glándula tiroideas
 Luteoma estromal tecoma
 Timoma, maligno
 Timoma, maligno, medular
 Tiroides/cerebro, anaplásico
 Tricoblastoma, piel
 Tumor tritón, maligno, cavidad nasal
 Tumor trofoblástico, conducto de Falopio
 Tumor trofoblástico, sitio placentario
 Cáncer uretral
 Vipoma (células de los islotes)
 Cáncer vulvar
 Macroglobulinemia de Waldenstrom
 Tumor de Wilms, nefroblastoma
 Tumor de Wilms, pulmón

Tabla 2 - Medicaciones ejemplares para el cáncer

Acetato de abiraterona
 Abitrexato (metotrexato)
 Adriamicina (doxorrubicina hidrocloreto)
 Adrucilo (fluorouracilo)
 Afinitor (Everolimus)
 Aldara (Imiquimod)
 Aldesleuquina
 Alemtuzumab
 Alimta (Pemetrexed Disodio)
 Aloxi (Palonosetron hidrocloreto)
 Amboclorina (Clorambucilo)
 Amboclorina (Clorambucilo)
 Ácido aminolevulínico
 Anastrozol

Aprepitant
 Arimidex (Anastrozol)
 Aromasina (Exemestano)
 Arranon (Nelarabina)
 Trióxido de arsénico
 Arzerra (Ofatumumab)
 Avastina (Bevacizumab)
 Azacitidina
 Bendamustina hidrocloreuro
 Bevacizumab
 Bexaroteno
 Bexxar (Tositumomab y Tositumomab yodo I131)
 Bleomicina
 Bortezomib
 Cabazitaxel
 Campath (Alemtuzumab)
 Camptosar (Irinotecán hidrocloreuro)
 Capecitabina
 Carboplatino
 Cerubidina (Daunorubicina hidrocloreuro)
 Cervarix (vacuna bivalente del VPH recombinante)
 Cetuximab
 Clorambucilo
 Cistplatino
 Clafén (ciclofosfamida)
 Clofarabina
 Clofarex (Clofarabina)
 Clolar (Clofarabina)
 Ciclofosfamida
 Cyfos (Ifosfamida)
 Citarabina
 Citarabina, Liposomal
 Cytosar-U (Citarabina)
 Cytosan (Ciclofosfamida)
 Dacarbazina
 Dacogen (Decitabina)
 Dasatinib
 Daunorubicina hidrocloreuro
 Decitabina
 Degarelix
 Denileukin Diftitox
 Denosumab
 DepoCyt (citarabina liposómica)
 DepoFoam (citarabina liposómica)
 Dexrazoxano hidrocloreuro
 Docetaxel
 Doxorubicina hidrocloreuro
 Efudex (fluorouracilo)
 Elitek (rasburicasa)
 Ellence (epirubicina hidrocloreuro)
 Eloxatin (oxaliplatino)
 Eltrombopag Olamina
 Emend (aprepitant)
 Epirubicina hidrocloreuro
 Erbitux (cetuximab)
 Mesilato de eribulín
 Erlotinib hidrocloreuro
 Etopophos (etopósido fosfato)
 Etopósido
 Etopósido fosfato
 Everolimus
 Evista (raloxifeno hidrocloreuro)
 Exemestano
 Fareston (toremifeno)
 Faslodex (fulvestrant)
 Femara (letrozol)

Filgrastim
 Fludara (fludarabina fosfato)
 Fludarabina fosfato
 Fluoroplex (fluorouracilo)
 Fluorouracilo
 Folex (metotrexato)
 Folex PFS (metotrexato)
 Folutyn (pralatrexato)
 Fulvestrant
 Gardasil (vacuna tetravalente de VPH recombinante)
 Gefitinib
 Gemcitabina hidrocloreto
 Gemtuzumab Ozogamicina
 Gemzar (hidrocloreto de gemcitabina)
 Gleevec (mesilato de imatinib)
 Halaven (mesilato de eribulina)
 Herceptina (trastuzumab)
 Vacuna bivalente de VPH recombinante
 Vacuna tetravalente de VPH recombinante
 Hycamtin (topotecán hidrocloreto)
 Ibritumomab Tiuxetán
 Ifex (Ifosfamida)
 Ifosfamida
 Ifosfamidum (Ifosfamida)
 Mesilato de imatinib
 Imiquimod
 Ipilimumab
 Iressa (gefitinib)
 Irinotecán hidrocloreto
 Istodax (romidepsina)
 Ixabepilona
 Ixempra (ixabepilona)
 Jevtana (cabazitaxel)
 Keoxifene (raloxifeno hidrocloreto)
 Kepivance (palifermina)
 Ditosilato de lapatinib
 Lenalidomida
 Letrozol
 Leucovorina Calcio
 Leukeran (clorambucilo)
 Acetato de leuprólido
 Levulan (ácido aminolevulínico)
 Linfofolizina (Clorambucilo)
 LipoDox (liposoma con doxorubicina hidrocloreto)
 Citarabina liposómica
 Lupron (acetato de leuprólido)
 Lupron Depot (acetato de leuprólido)
 Lupron Depot-Ped (acetato de leuprólido)
 Lupron Depot-3 Meses (acetato de leuprólido)
 Lupron Depot-4 Meses (acetato de leuprólido)
 Matulano (Procarbazina hidrocloreto)
 Metazolastona (Temozolomida)
 Metotrexato
 Metotrexato LPF (Metotrexato)
 Mexate (Metotrexato)
 Mexate-AQ (Metotrexato)
 Mozobil (Plerixafor)
 Mylosar (Azacitidina)
 Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicina)
 Nanopartícula Paclitaxel (formulación de nanopartículas estabilizada con albúmina de paclitaxel)
 Nelarabina
 Neosar (Ciclofosfamida)
 Neupogen (Filgrastim)
 Nexavar (tosilato de sorafenib)
 Nilotinib
 Nolvadex (citrate de tamoxifeno)

Nplate (Romiplostim)
 Ofatumumab
 Oncaspar (Pegaspargasa)
 Ontak (Denileukin Diftitox)
 Oxaliplatino
 Paclitaxel
 Palifermina
 Palonosetron hidrocloreuro
 Panitumumab
 Paraplat (Carboplatino)
 Paraplatino (Carboplatino)
 Pazopanib hidrocloreuro
 Pegaspargasa
 Pemetrexed Disodo
 Platinol (Cisplatino)
 Platinol-AQ (Cisplatino)
 Plerixafor
 Pralatrexato
 Prednisona
 Procarbazina hidrocloreuro
 Proleuquina (aldesleuquina)
 Prolia (denosumab)
 Promacta (eltrombopag Olamina)
 Provenge (sipuleucel-T)
 Raloxifeno hidrocloreuro
 Rasburicasa
 Vacuna bivalente de VPH recombinante
 Gardasil (vacuna tetravalente de VPH recombinante)
 Revlimid (Lenalidomida)
 Rheumatrex (Metotrexato)
 Rituxan (Rituximab)
 Rituximab
 Romidepsina
 Romiplostim
 Rubidomicina (daunorubicina hidrocloreuro)
 Aerosol intrapleural sclerosol (Talco)
 Sipuleucel-T
 Tosilato de sorafenib
 Sprycel (Dasatinib)
 Polvos de talco estériles (Talco)
 Steritalc (Talco)
 Malato de sunitinib
 Sutent (malato de sunitinib)
 Synovir (Talidomida)
 Talco
 Citrato de tamoxifeno
 Tarabine PFS (Citarabina)
 Tarceva (Erlotinib hidrocloreuro)
 Targretin (Bexaroteno)
 Tassigna (Nilotinib)
 Taxol (Paclitaxel)
 Taxotere (Docetaxel)
 Temodar (Temozolomida)
 Temozolomida
 Temsirolimus
 Talidomida
 Thalomid (Talidomida)
 Toposar (Etopósido)
 Topotecán hidrocloreuro
 Toremifeno
 Torisel (Temsirrolimus)
 Tositumomab y Tositumomab yodo I131
 Totect (Dexrazoxano hidrocloreuro)
 Trastuzumab
 Treanda (Bendamustina hidrocloreuro)
 Trisenox (tríóxido de arsénico)

Tykerb (ditosilato de lapatinib)
 Vandetanib
 Vectibix (Panitumumab)
 Velban (sulfato de vinblastina)
 Velcade (Bortezomib)
 Velsar (sulfato de vinblastina)
 VePesid (Etopoósido)
 Viadur (acetato de leuprólido)
 Vidaza (Azacitidina)
 Sulfato de vinblastina
 Vincasar PFS (sulfato de vincristina)
 Sulfato de vincristina
 Vorinostat
 Votrient (Pazopanib hidrocloreuro)
 Wellcovorin (Leucovorin Calcio)
 Xeloda (Capecitabina)
 Xgeva (Denosumab)
 Yervoy (Ipilimumab)
 Zevalin (Ibritumomab Tiuxetán)
 Zinecard (Dexrazoxano hidrocloreuro)
 Ácido zoledrónico
 Zolinza (Vorinostat)
 Zometa (ácido zoledrónico)
 Zytiga (acetato de abiratenona)

Tabla 3 - Enfermedades y estados oculares ejemplificativos

Entre los ejemplos de enfermedades "parte posterior del ojo" se incluyen:

- edema macular, tal como edema macular cistoide angiográfico
- isquemia retiniana y neovascularización coroidal
- degeneración macular

- enfermedades retinianas (p.ej., retinopatía diabética, edema retiniano diabético, desprendimiento retiniano); enfermedades inflamatorias, tales como uveitis (incluyendo la panuveitis) o coroiditis (incluyendo la coroiditis multifocal) de causa desconocida (idiopática) o asociada a una enfermedad sistémica (p.ej., autoinmunitaria), episcleritis o escleritis.

- Retinocoroidopatía en perdigonada

- enfermedades vasculares (isquemia retiniana, vasculitis retiniana, insuficiencia vascular coroidal, trombosis coroidal)
 - neovascularización del nervio óptico
 - neuritis óptica

Entre los ejemplos de enfermedades de "parte frontal del ojo" se incluyen:

- blefaritis
- queratitis
- rubeosis iridis
- iridociclitis heterocrómica de Fuchs
- uveitis crónica o uveitis crónica
- conjuntivitis
- conjuntivitis alérgica (incluyendo estacional o perenne, vernal, atópica y papilar gigante)
- queratoconjuntivitis seca (síndrome del ojo seco)
- iridociclitis
- iritis
- escleritis
- episcleritis
- edema corneal
- enfermedad escleral
- penfigoide cicatricial ocular
- *Pars planitis*
- síndrome de Posner Schlossman
- enfermedad de Behcet

- síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada
- reacciones de hipersensibilidad
- edema conjuntival
- congestión venosa conjuntival
- celulitis periorbital, dacriocistitis aguda
- vasculitis no específica
- sarcoidosis

Tabla 4 - Medicaciones oculares ejemplificativas

Atropina
 Brimondina (Alphagan)
 Ciloxán
 Eritromicina
 Gentamicina
 Levobunolol (Betagan)
 Metipranolol (Optipranolol)
 Optivar
 Patanol
 PredForte
 Proparacaína
 Timoptic
 Trusopt
 Visudyne (Verteporfina)
 Voltarén
 Xalatan

5 Tabla 5 - Enfermedades y estados ejemplificativos que afectan a los pulmones

Bronquitis aguda
 Síndrome del distrés respiratorio agudo (ARDS)
 Asbestosis
 Asma
 Bronquiectasia
 Bronquiolitis
 Displasia broncopulmonar
 Bisinosis
 Bronquitis crónica
 Coccidioidomicosis (Cocci)
 COPD
 Fibrosis quística
 Enfisema
 Síndrome pulmonar por hantavirus
 Histoplasmosis
 Metaneumovirus humano
 Neumonitis por hipersensibilidad
 Influenza
 Cáncer de pulmón
 Linfagiomatosis
 Mesotelioma
 Mycobacterium no tuberculosis
 Pertussis
 Neumoconiosis
 Neumonía
 Disquinesia ciliar primaria
 Hipertensión pulmonar primaria
 Hipertensión arterial pulmonar
 Fibrosis pulmonar
 Enfermedad vascular pulmonar
 Virus sincitial respiratorio
 Sarcoidosis
 Síndrome respiratorio agudo severo
 Silicosis
 Apnea del sueño
 Síndrome de la muerte súbita infantil
 Tuberculosis

Tabla 6 - Medicaciones ejemplificativas para enfermedades del pulmón/respiratorias:

Accolate
 Accolate
 Adcirca (tadalafil)
 Aldurazyme (laronidasa)
 Allegra (fexofenadina hidrocloreto)
 Allegra-D
 Alvesco (ciclesónido)
 Pulverizador nasal Astelin
 Atrovent (bromuro de ipratropio)
 Augmentin (amoxicilina/clavulanato)
 Avelox I.V. (Moxifloxacina hidrocloreto)
 Azmacort (acetónido de triamcinolona) aerosol de inhalación
 Biaxin XL (tabletas de liberación prolongada de claritromicina)
 Breathe Right
 Brovana (tartrato de arformoterol)
 Cafcit Inyección
 Cayston (solución de aztreonam para inhalación)
 Cedax (ceftibuteno)
 Cefazolina y dextrosa USP
 Ceftin (cefuroxima axetilo)
 Cipro (ciprofloxacino HCl)
 Clarinex
 Claritin RediTabs (tableta de desintegración rápida de 10 mg de loratadina)
 Claritin Jarabe (loratadina)
 Claritin-D 24 Hour Tabletas de liberación prolongada (10 mg de loratadina, 240 mg de sulfato de pseudoefedrina)
 Fumarato de clemastina jarabe
 Covera-HS (verapamilo)
 Curosurf
 Daliresp (roflumilast)
 Dulera (furoato de mometasona + fumarato de formoterol dihidrato)
 DuoNeb (sulfato de albuterol y bromuro de ipratropio)
 Dynabac
 Flonasa pulverizador nasal
 Flovent Rotadisk
 Foradil Aerolizer (polvos para inhalación de fumarato de formoterol)
 Infasurf
 Invanz
 Iressa (gefitinib)
 Ketek (telitromicina)
 Letairis (ambrisentán)
 Sulfato de metaproterol solución para inhalación, al 5%
 Nasacort AQ (acetónido de triamcinolona) pulverizador nasal
 Nasacort AQ (acetónido de triamcinolona) pulverizador nasal
 NasalCrom pulverizador nasal
 OcuHist
 Omnicef
 Patanasa (olopatadina hidrocloreto)
 Priftin
 Proventil HFA Aerosol para inhalación
 Pulmozyme (dornasa alfa)
 Pulmozyme (dornasa alfa)
 Qvar (dipropionato de beclometasona)
 Raxar (grepafloxacino)
 Remodulin (treprostinilo)
 RespiGam (inmunoglobulina intravenosa para virus sincitial respiratorio)
 Rhinocort Aqua pulverizador nasal
 Aerosol intrapelural sclerosol
 Serevent
 Singulair
 Spiriva HandiHaler (bromuro de tiotropio)
 Synagis
 Tavist (fumarato de clemastina)
 Tavist (fumarato de clemastina)

Teflaro (ceftarolina fosamilo)
 Tequin
 Tikosyn Cápsulas
 Tilade (nedocromilo sodio)
 Tilade (nedocromilo sodio)
 Tilade (nedocromilo sodio)
 Tobi
 Tracleer (bosentán)
 Tri-Nasal pulverizador (pulverizador de acetónido de triamcinolona)
 Tripedia (toxoides diftérico y tetánico y vacuna pertussis acelular adsorbida)
 Tygacil (tigeciclina)
 Tyvaso (treprostínilo)
 Vancenase AQ 84 mcg Doble concentración
 Vanceril 84 mcg Doble concentración (dipropionato de beclometasona, 84 mcg) Aerosol para inhalación
 Ventolin HFA (aerosol para inhalación de sulfato de albuterol)
 Visipaque (iodixanol)
 Xolair (omalizumab)
 Xopenex
 Xyzal (levocetirizina dihidrocloruro)
 Zagam (sparfloxacin) comprimidos
 Zemaira (inhibidor de alfa1-proteinasa)
 Zosyn (piperacilina sodio estéril/tazobactam sodio)
 Zylflo (Zileuton)
 Zyrtec (cetirizina HCl)

Tabla 7 - Enfermedades y estados ejemplificativos que afectan al corazón:

Infarto de miocardio
 Aterosclerosis
 Hipertensión
 Enfermedad cardíaca isquémica
 Trastornos del ritmo cardíaco
 Taquicardia
 Soplos cardíacos
 Enfermedad cardíaca reumática
 Enfermedad cardíaca pulmonar
 Enfermedad cardíaca hipertensiva
 Enfermedad cardíaca valvular
 Endocarditis infecciosa
 Enfermedades cardíacas congénitas
 Enfermedad cardíaca coronaria
 Mixoma auricular
 HOCM
 Síndrome del QT largo
 Síndrome de Wolff Parkinson White
 Taquicardia supraventricular
 Aleteo auricular
 Pericarditis constrictiva
 Mixoma auricular
 Síndrome del QT largo
 Síndrome de Wolff Parkinson White
 Taquicardia supraventricular
 Aleteo auricular

5 Tabla 8 - Medicaciones ejemplificativas del corazón

Inhibidores de la ACE
 ácido acetilsalicílico, aspirina, ecotrina
 alteplasa, Activasa, TPA
 anistreplasa-inyección, eminasas
 aspirina y medicaciones antiplaquetarias
 atenolol, tenormina
 atorvastatina, Lipitor
 benazeprilo, lotensina
 beta-bloqueantes
 secuestrantes de ácidos biliares

bloqueantes de los canales del calcio
 captoprilo e hidroclorotazida, capóside
 captopril, Capoten
 bisulfato de clopidogrel, Plavix
 colesevelam, Welchol
 dipiridamol-oral, Persantina
 enalaprilo y hidroclorotiazida, Vaseretic
 enalaprilo, Vasotec
 ezetimiba y simvastatina, Vytorin
 Fibratos
 fluvastatina, Lescol
 fosinoprilo sodio, Monoprilo
 lisinoprilo y hidroclorotiazida, Zestoretic, Prinzide
 lisinoprilo, Zestrilo, Prinivilo
 lovastatina, Mevacor, Altacor
 sulfato de magnesio-inyección
 metoprolol, Lopressor, Toprol XL
 moexipril-oral, Univasc
 nadolol, Corgard
 Niacina y lovastatina, Advicor
 niacina, Niacor, Niaspan, Slo-Niacin
 nitroglicerina, Nitro-Bid, Nitro-Dur, Nitrostat, Transderm-
 Nitro, Minitran, Deponit, Nitrol
 oxprenolol-oral
 pravastatina, Pravachol
 pravastatina/aspirina tamponada-oral, Pravigard PAC
 propranolol, Inderal, Inderal LA
 quinapril hcl/hidroclorotiazida-oral, Accuretic
 quinapril, Accuprilo
 ramiprilo, Altace
 reteplase-inyección, Retavase
 simvastatina, Zocor
 estatinas
 estreptoquinasa-inyección, kabikinasa, estreptasa
 tosemida-oral, Demadex
 trandolapril, Mavik

Tabla 9 - Afecciones bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias ejemplificativas

Infecciones bacterianas causadas por:

- especies de *Borrelia*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus aureus*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium leprae*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Chlamydia trachomatis*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Infecciones víricas causadas por:

- *Herpes simplex*
- *Herpes zoster*
- Citomegalovirus

Infecciones fúngicas causadas por:

- *Aspergillus fumigatus*
- *Candida albicans*
- *Histoplasmosis capsulatum*
- especies de *Cryptococcus*
- *Pneumocystis carinii*

Infecciones parasitarias causadas por:

- *Toxoplasmosis gondii*
- *Trypanosome cruzi*
- especies de *Leishmania*
- especies de *Acanthamoeba*
- *Giardia lamblia*
- especies de *Septata*
- *Dirofilaria immitis*

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula que comprende:
- 5 a) un núcleo interno que comprende un material no celular; y
- b) una superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula humana o animal,
- 10 en la que dicho núcleo interno soporta la superficie externa y comprende un material biocompatible o sintético seleccionado de entre el grupo que consiste en poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), polilisina y ácido poliglutámico.
- 15 2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que la membrana celular es derivada de una célula sanguínea, una célula tumoral, una célula cancerosa, una célula inmunitaria, una célula troncal o una célula endotelial.
3. Nanopartícula según la reivindicación 1 o 2, que comprende además una carga liberable.
4. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, sistema de suministro de medicamento que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica según la reivindicación 4 para la utilización en un método para tratar o prevenir una enfermedad o un estado clínico.
- 25 6. Procedimiento para preparar la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 o 5 que comprende:
- 30 a) combinar el núcleo interno que comprende un material no celular, y la superficie externa que comprende una membrana plasmática derivada de una célula humana o animal; y
- b) ejercer una energía exógena sobre la combinación para formar una nanopartícula que comprende dicho núcleo interno y dicha superficie externa.
- 35 7. Composición inmunógena específica de neoplasma que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5 o la composición farmacéutica según las reivindicaciones 4 o 5, en la que la superficie externa comprende una membrana plasmática derivada de una célula de neoplasma humana o animal.
- 40 8. Composición inmunógena específica de neoplasma según la reivindicación 7 o vacuna que comprende la composición inmunógena específica de neoplasma según la reivindicación 7 para la utilización para tratar o prevenir un neoplasma.
- 45 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la membrana celular o plasmática es derivada de una célula diana.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 para la utilización para tratar o prevenir una enfermedad o un estado asociada/o a una toxina que forma poros.
- 50 11. Composición inmunógena que comprende una cantidad eficaz de la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la superficie externa de la nanopartícula comprende una membrana plasmática derivada de una célula humana o animal y una toxina que forma poros.
- 55 12. Vacuna que comprende la composición inmunógena según la reivindicación 11 para la utilización para proteger un sujeto contra una toxina que forma poros.
13. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la superficie externa de la nanopartícula comprende una membrana plasmática derivada de un glóbulo rojo o una plaqueta humano/a o animal.
- 60 14. Nanopartícula según la reivindicación 13, en la que el núcleo interno comprende poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).
- 65 15. Nanopartícula según la reivindicación 3, en la que la carga liberable es un agente terapéutico, un agente profiláctico, un agente diagnóstico o marcador, un agente pronóstico o una combinación de los mismos.

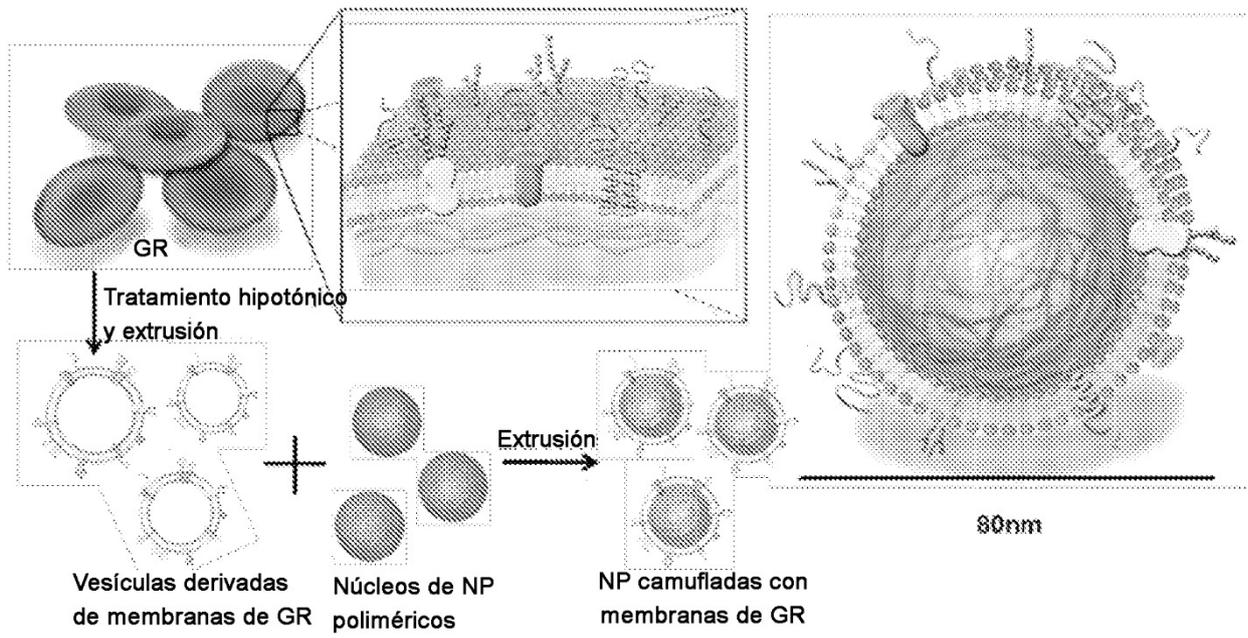


FIGURA 1

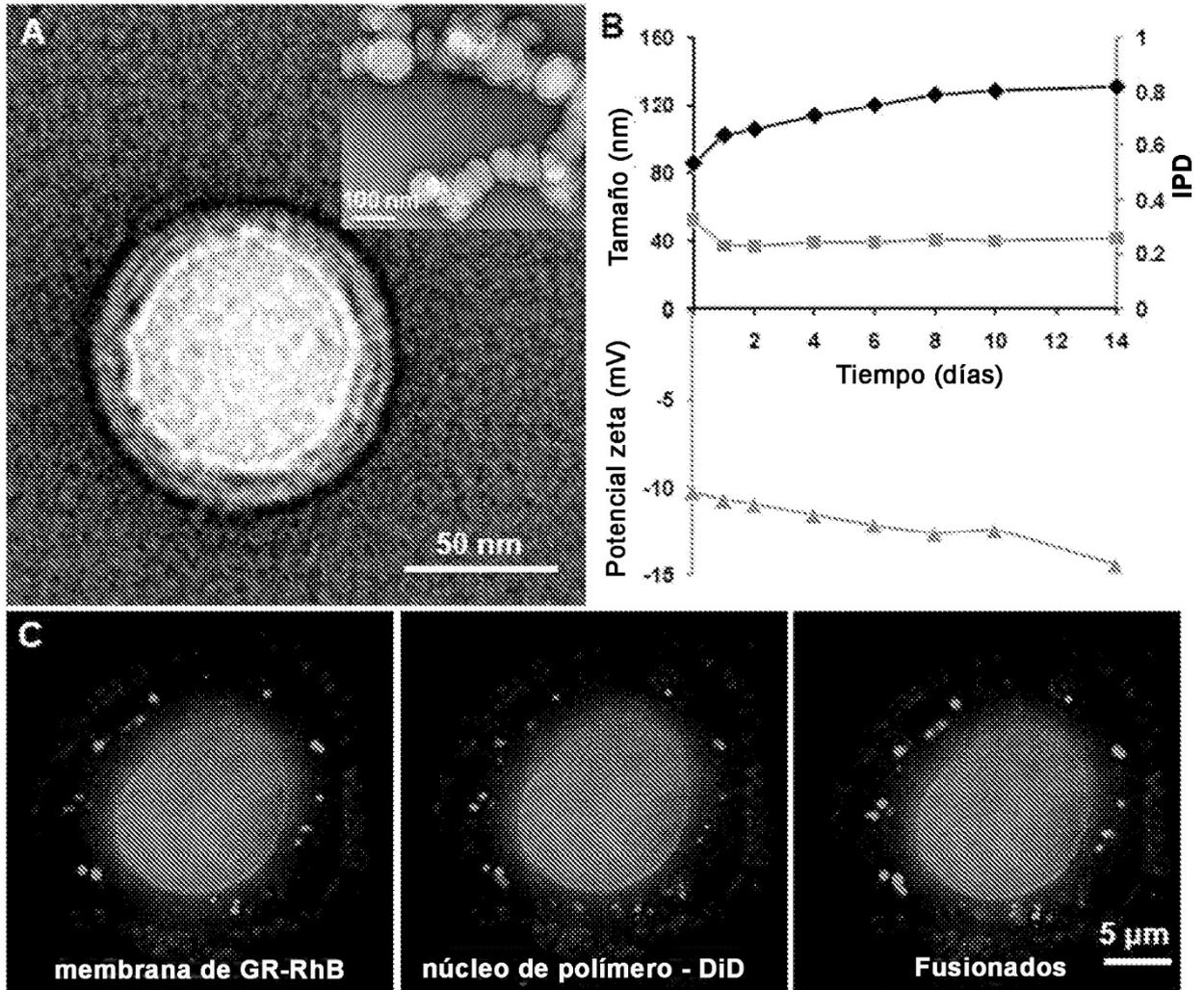


FIGURA 2

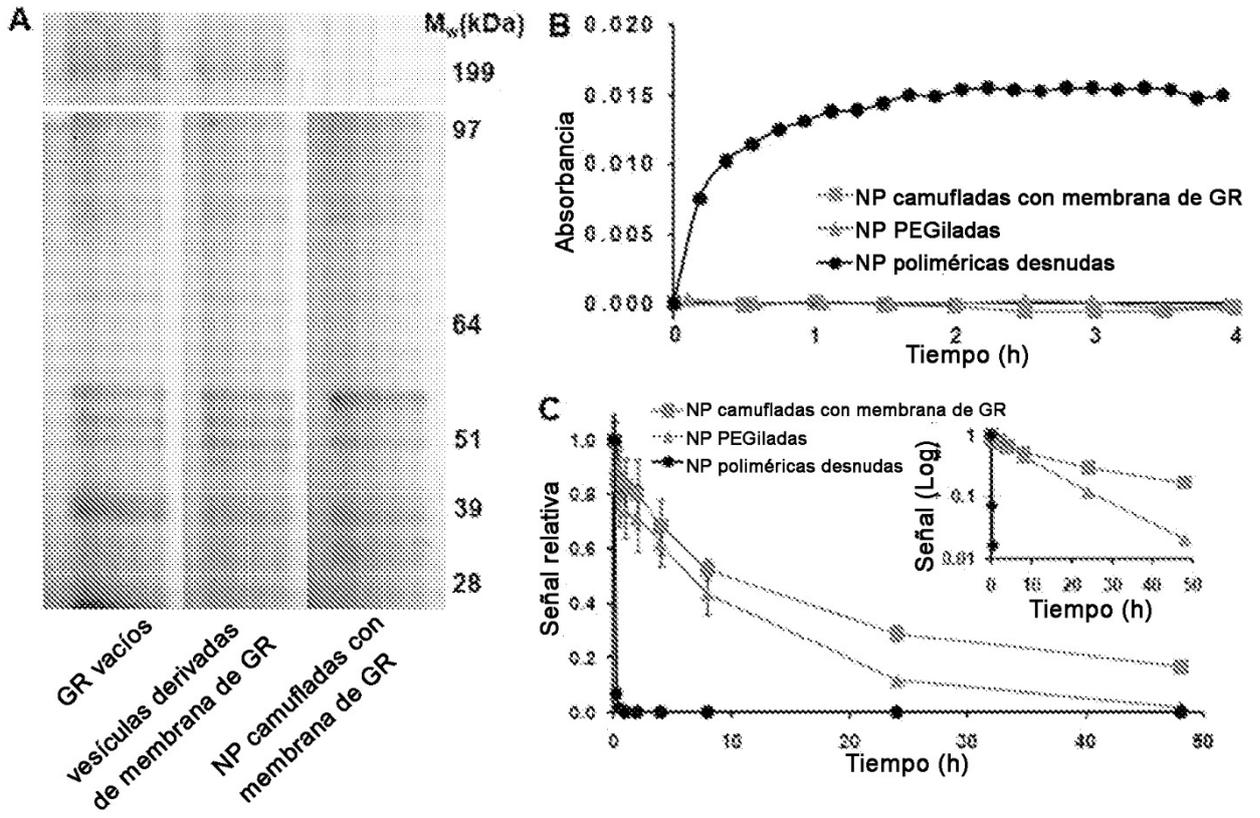


FIGURA 3

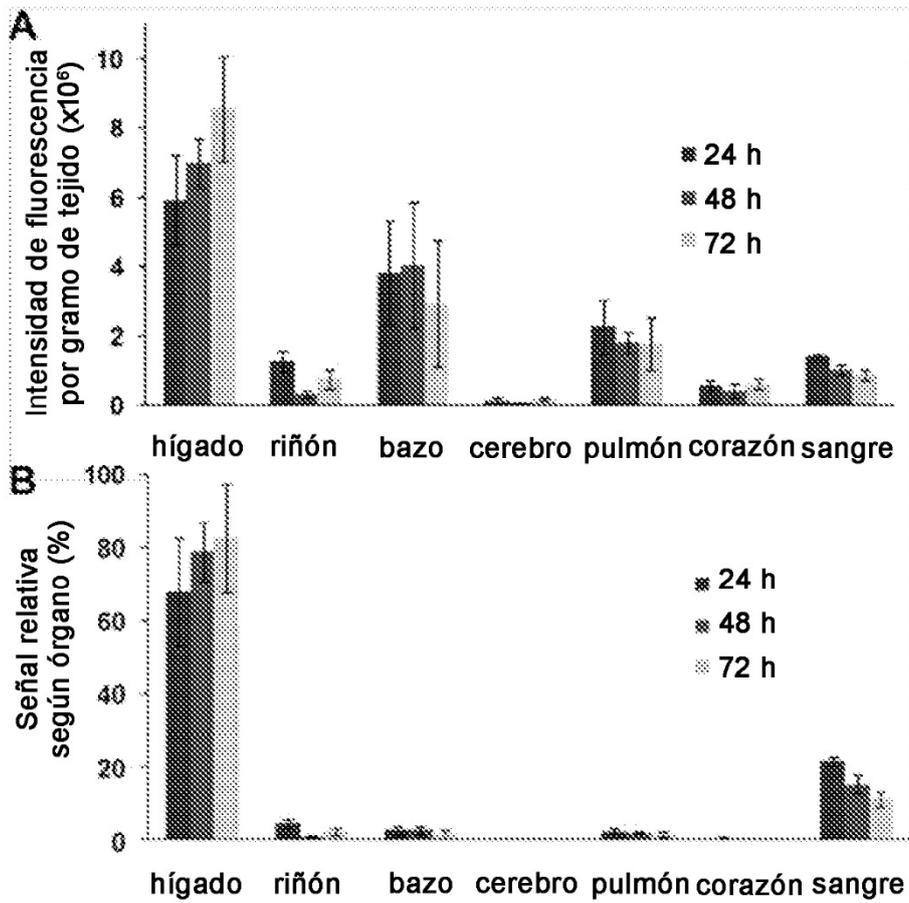


FIGURA 4

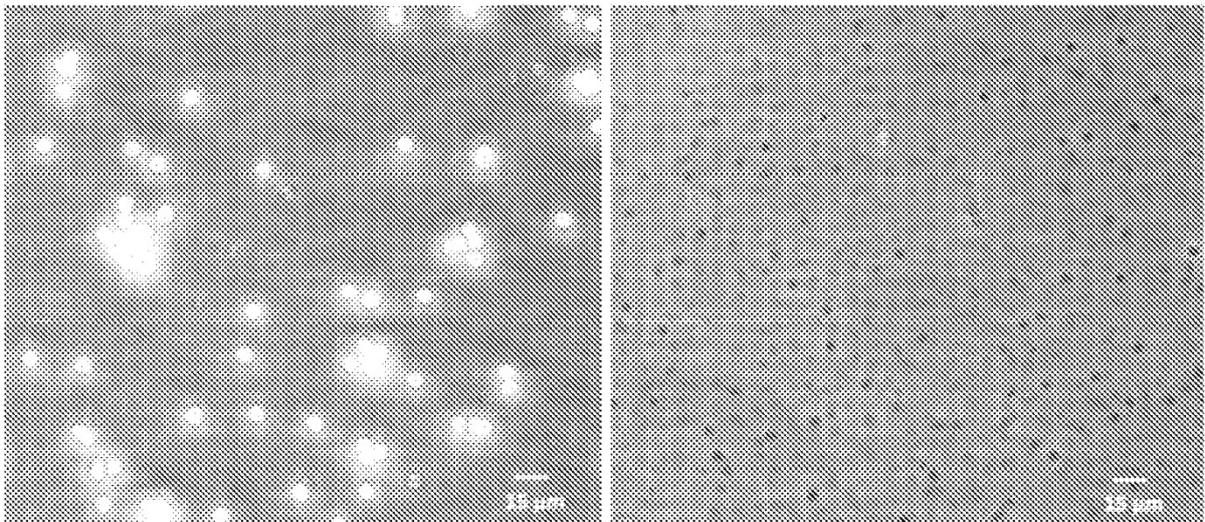


FIGURA 5

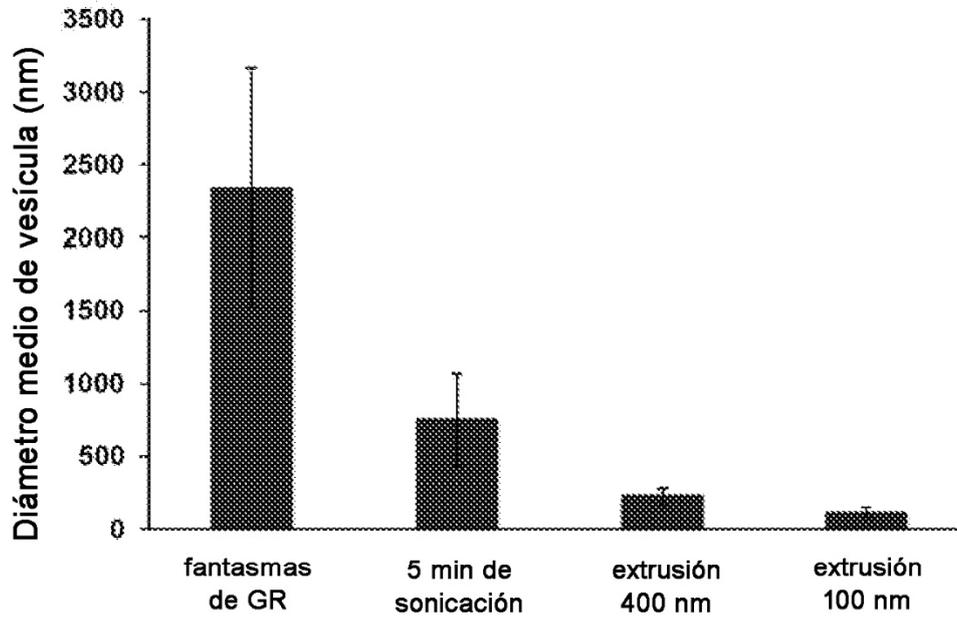


FIGURA 6

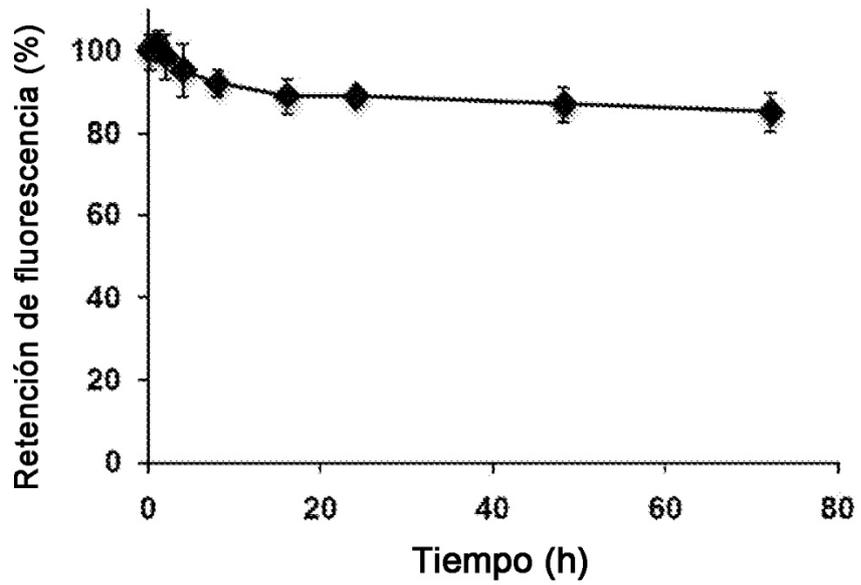


FIGURA 7

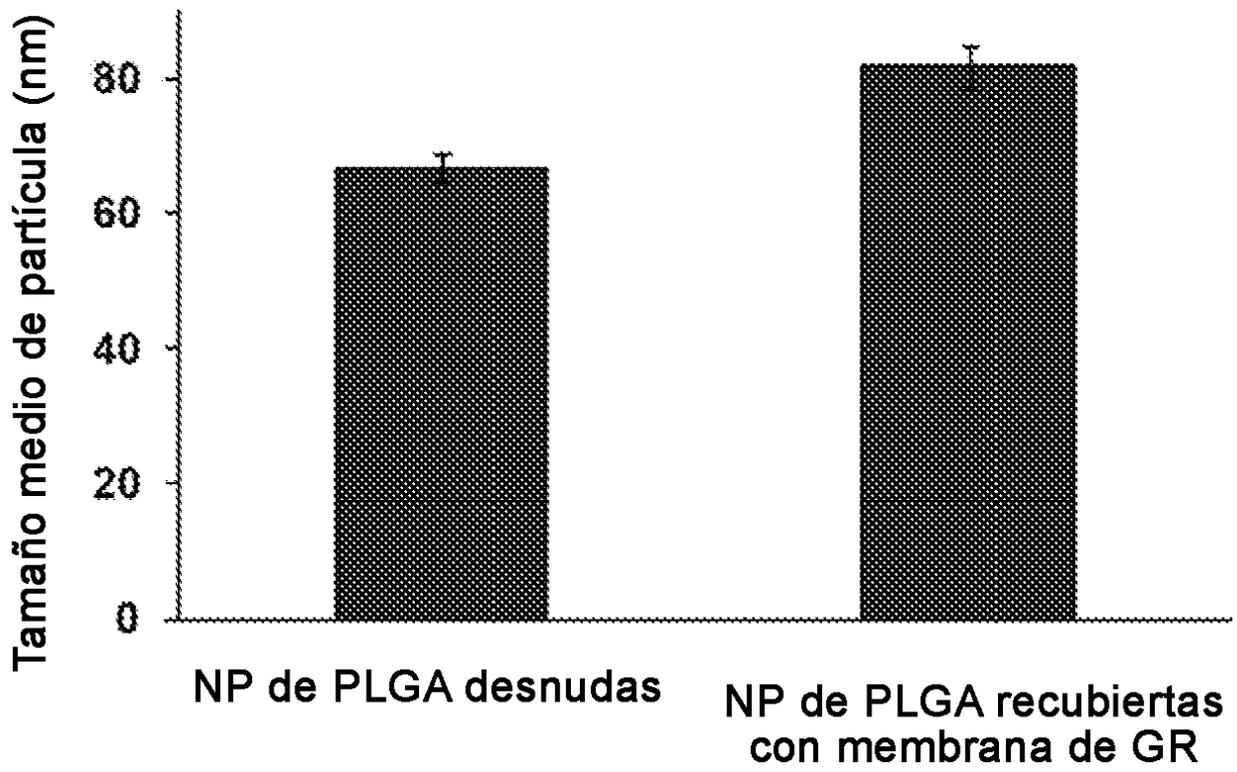


FIGURA 8

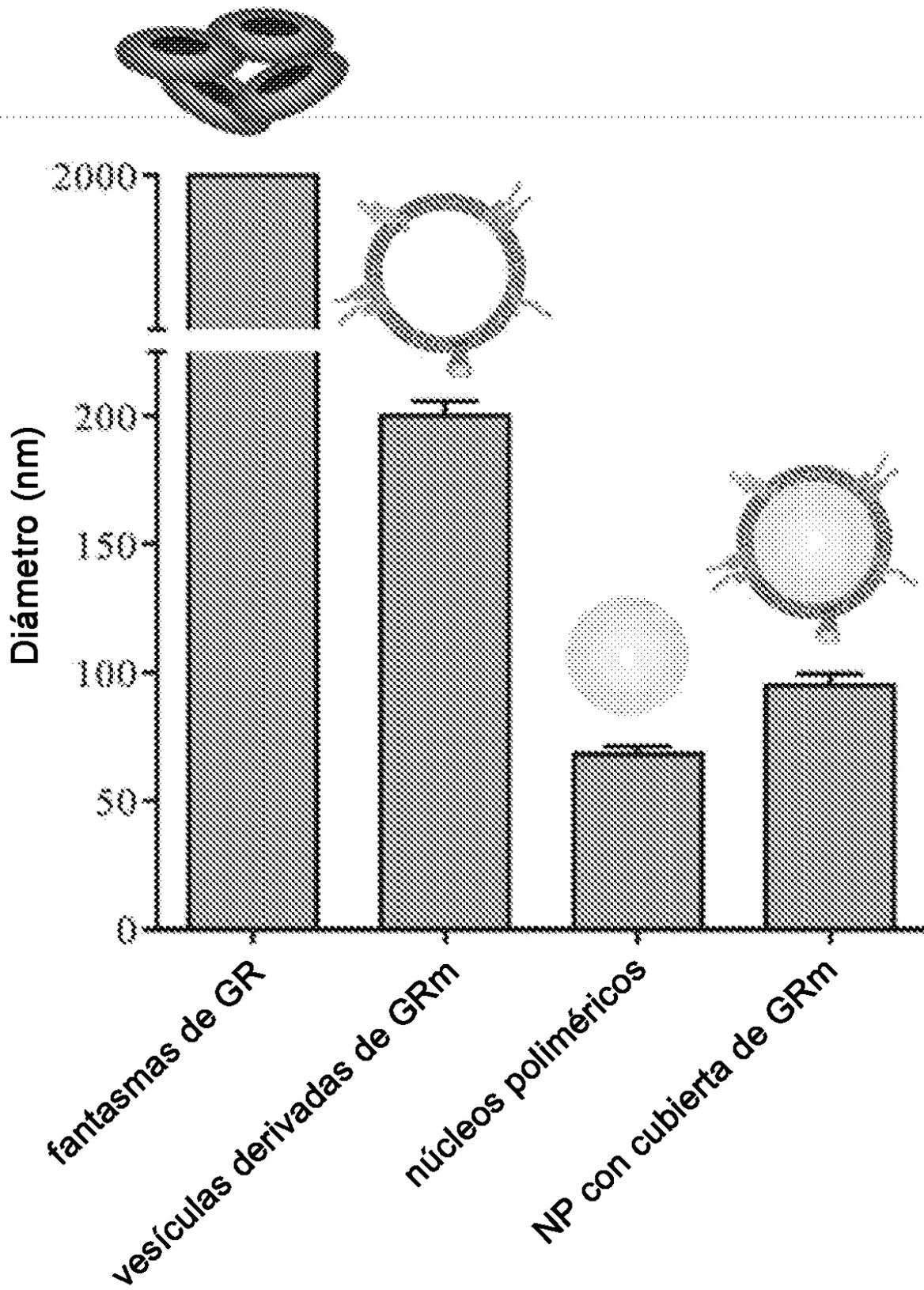


FIGURA 9

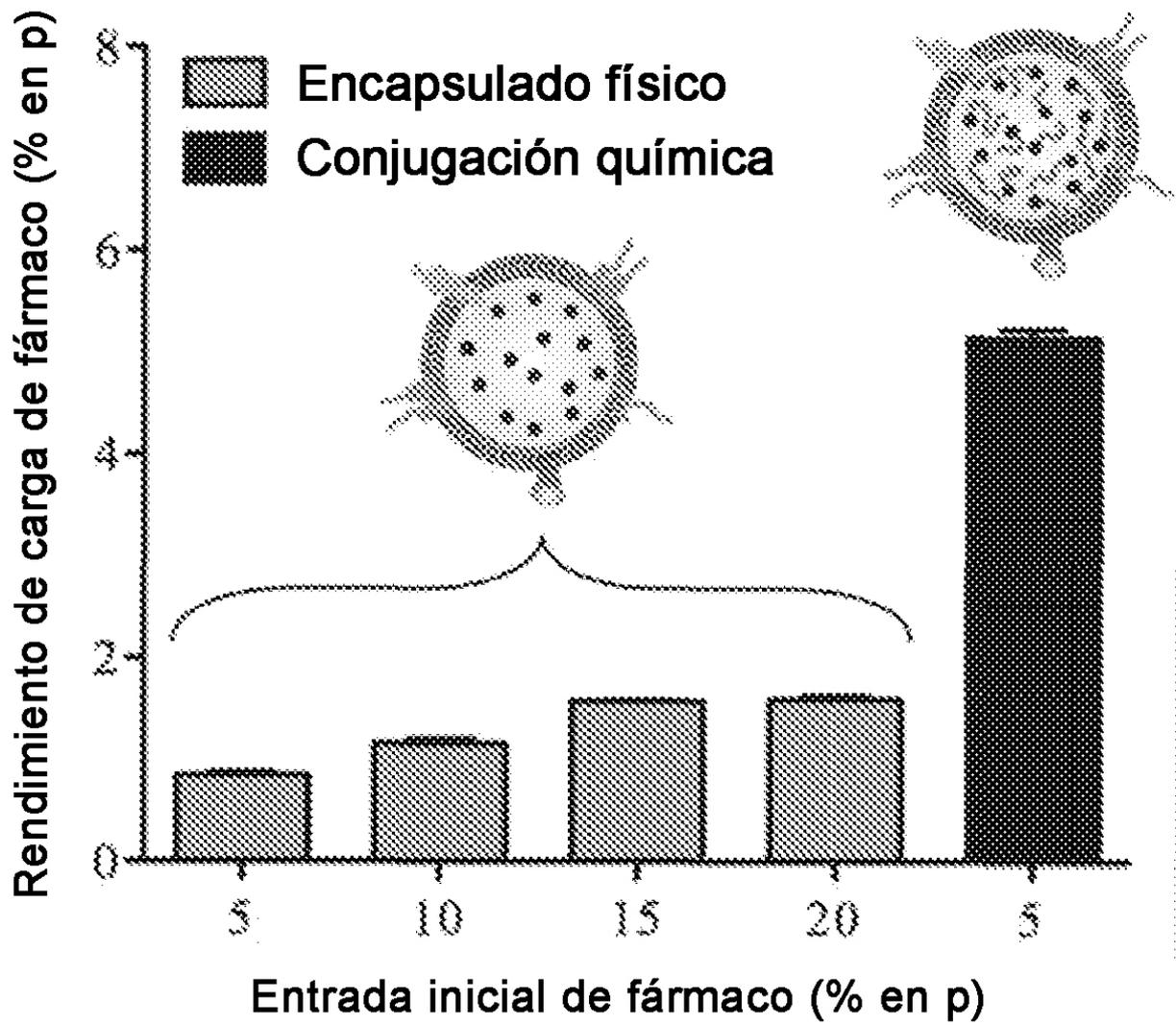


FIGURA 10

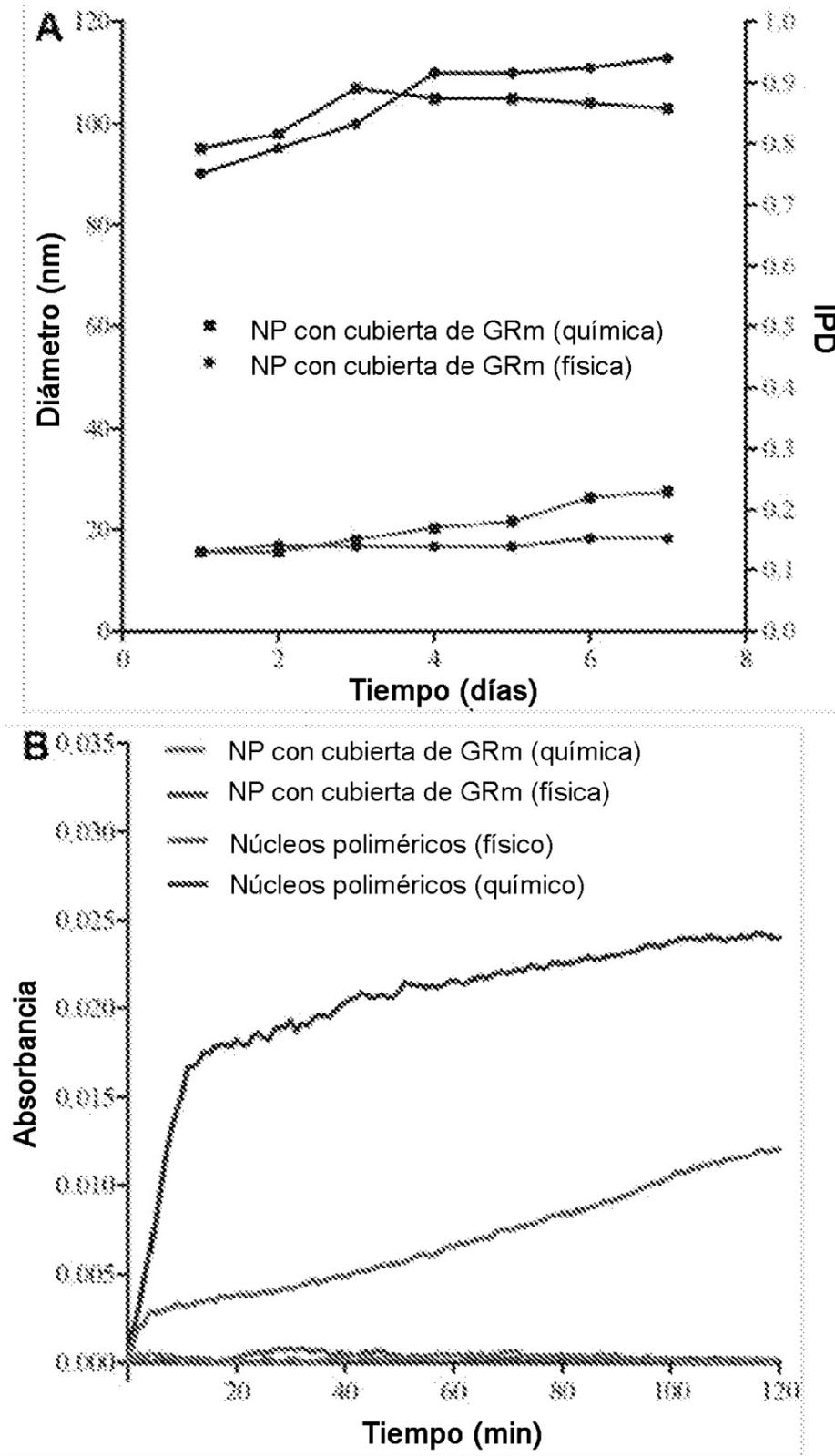


FIGURA 11

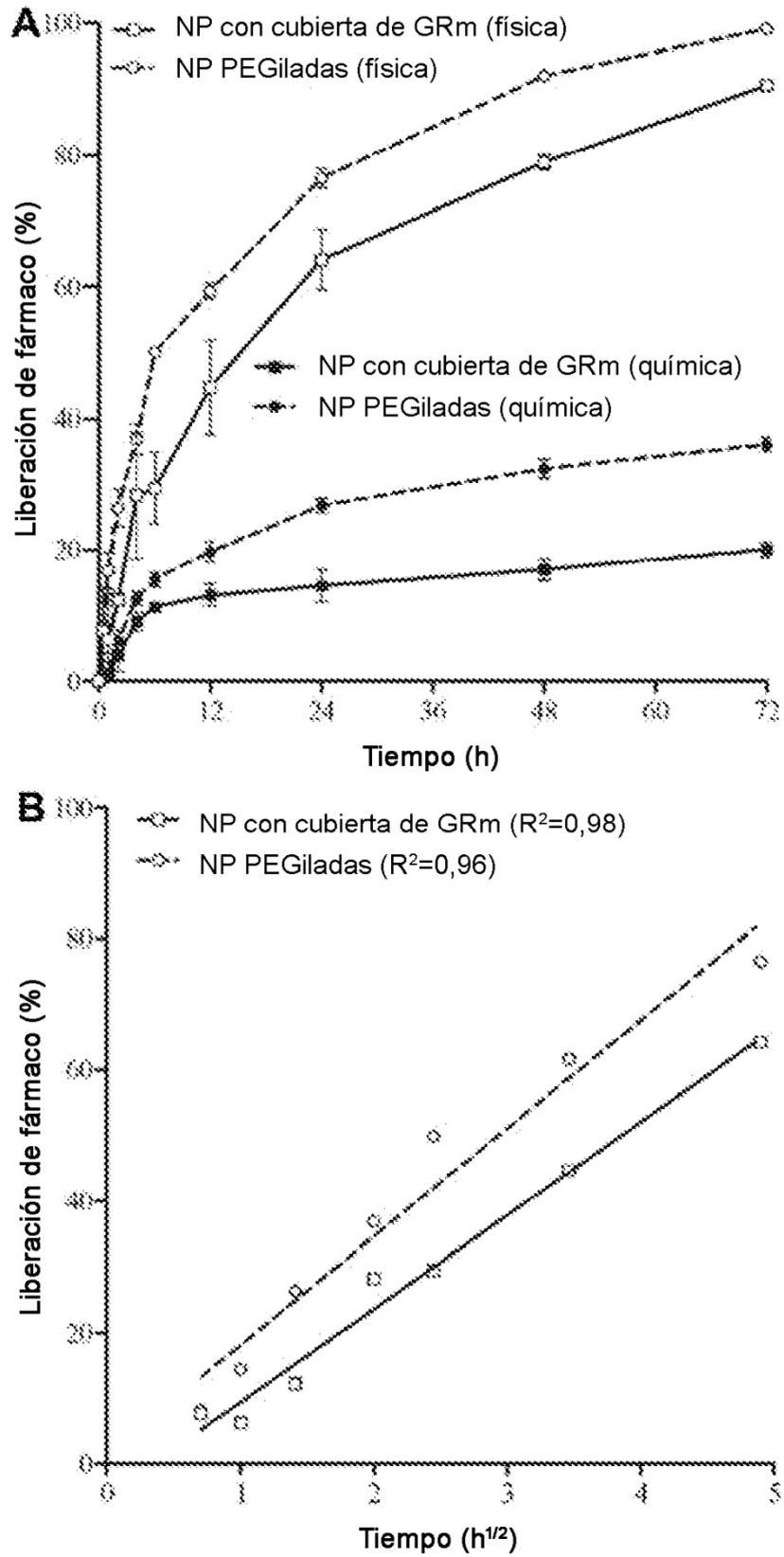


FIGURA 12

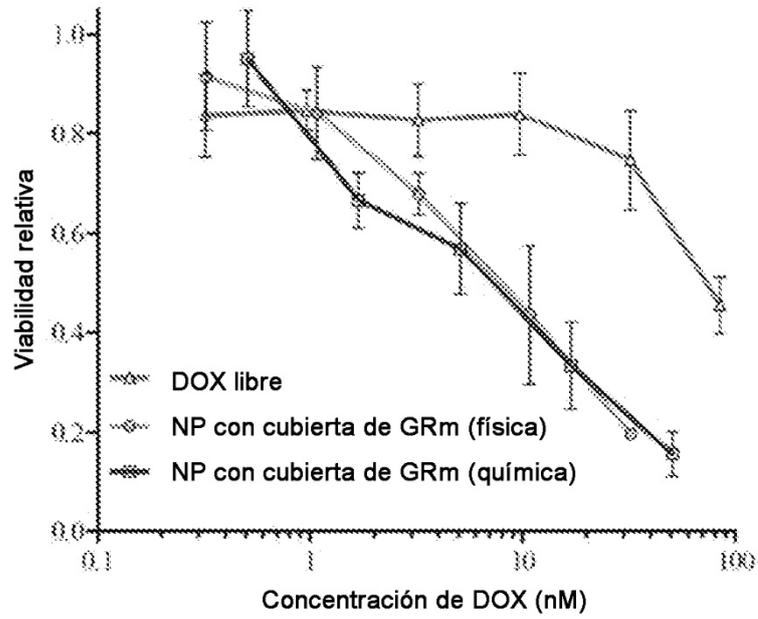


FIGURA 13

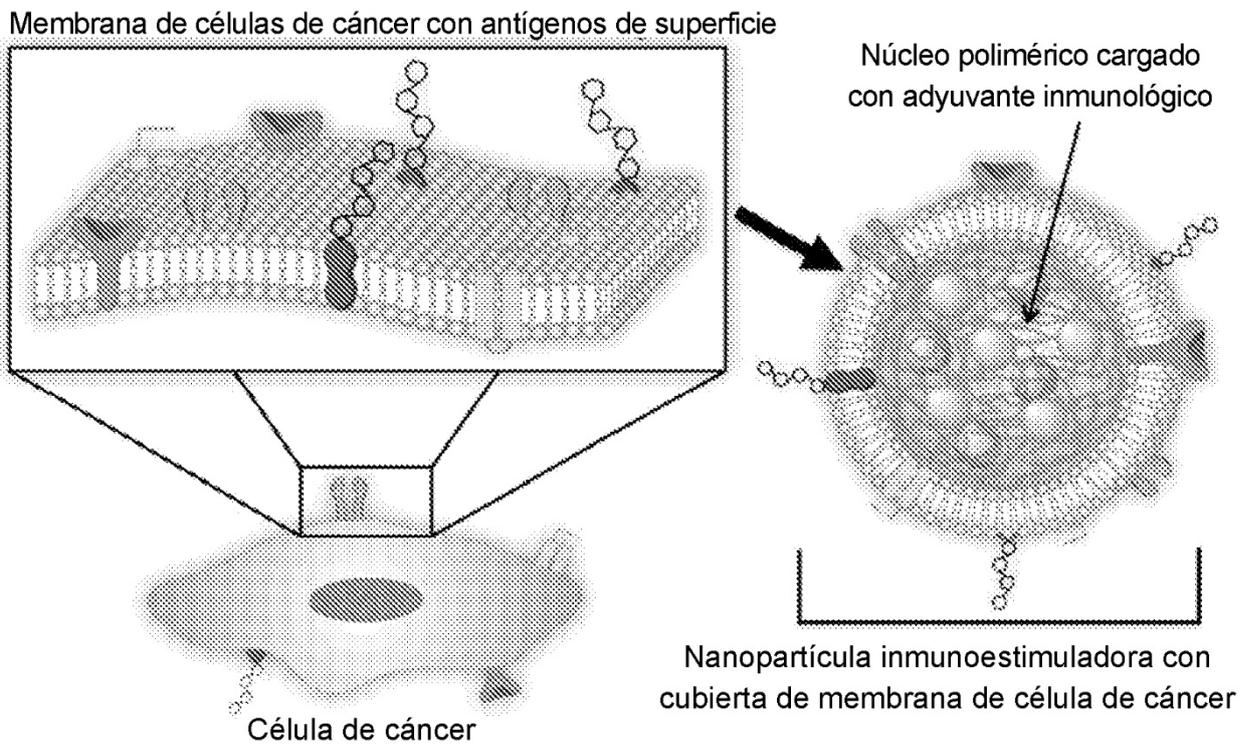


FIGURA 14

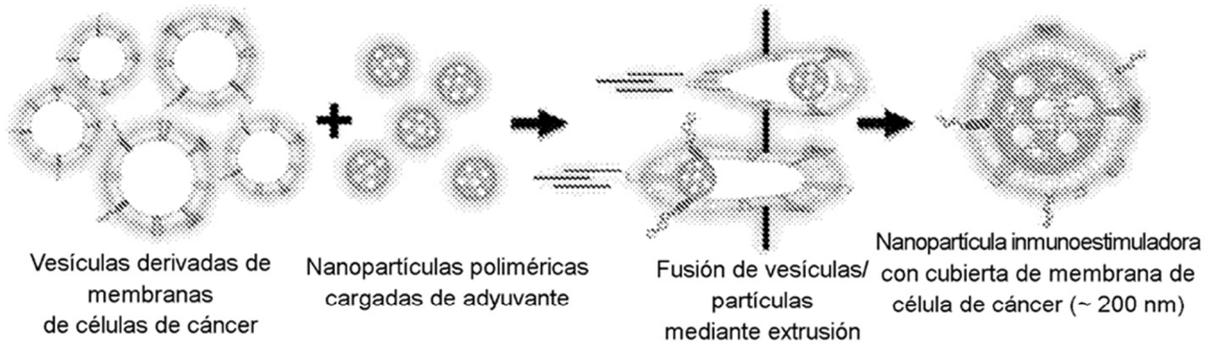


FIGURA 15

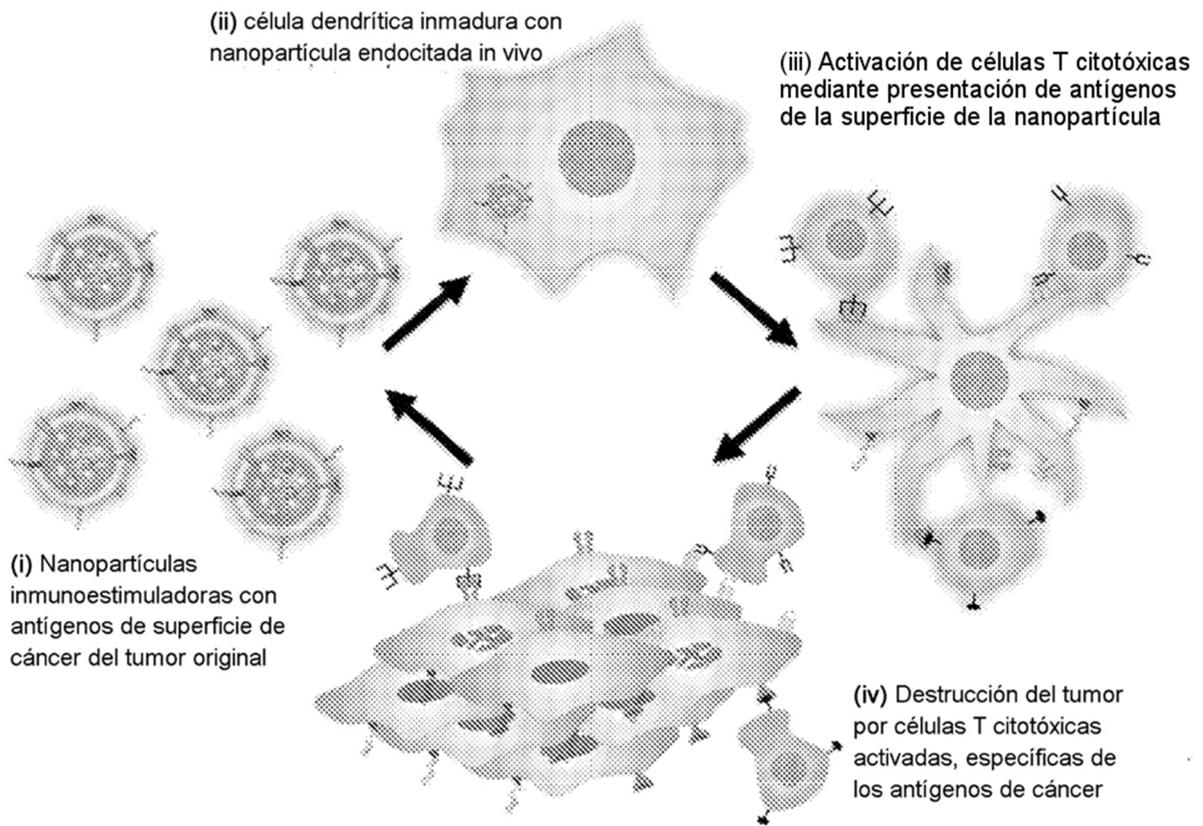


FIGURA 16

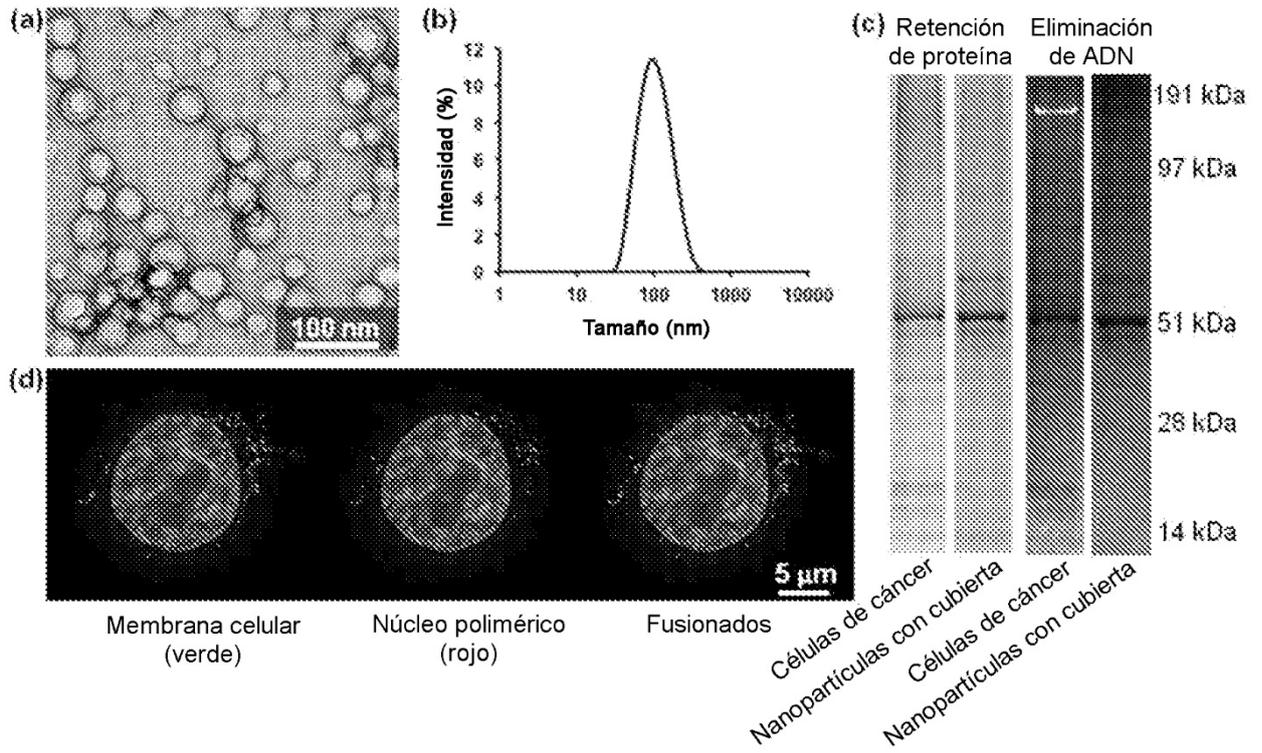


FIGURA 17

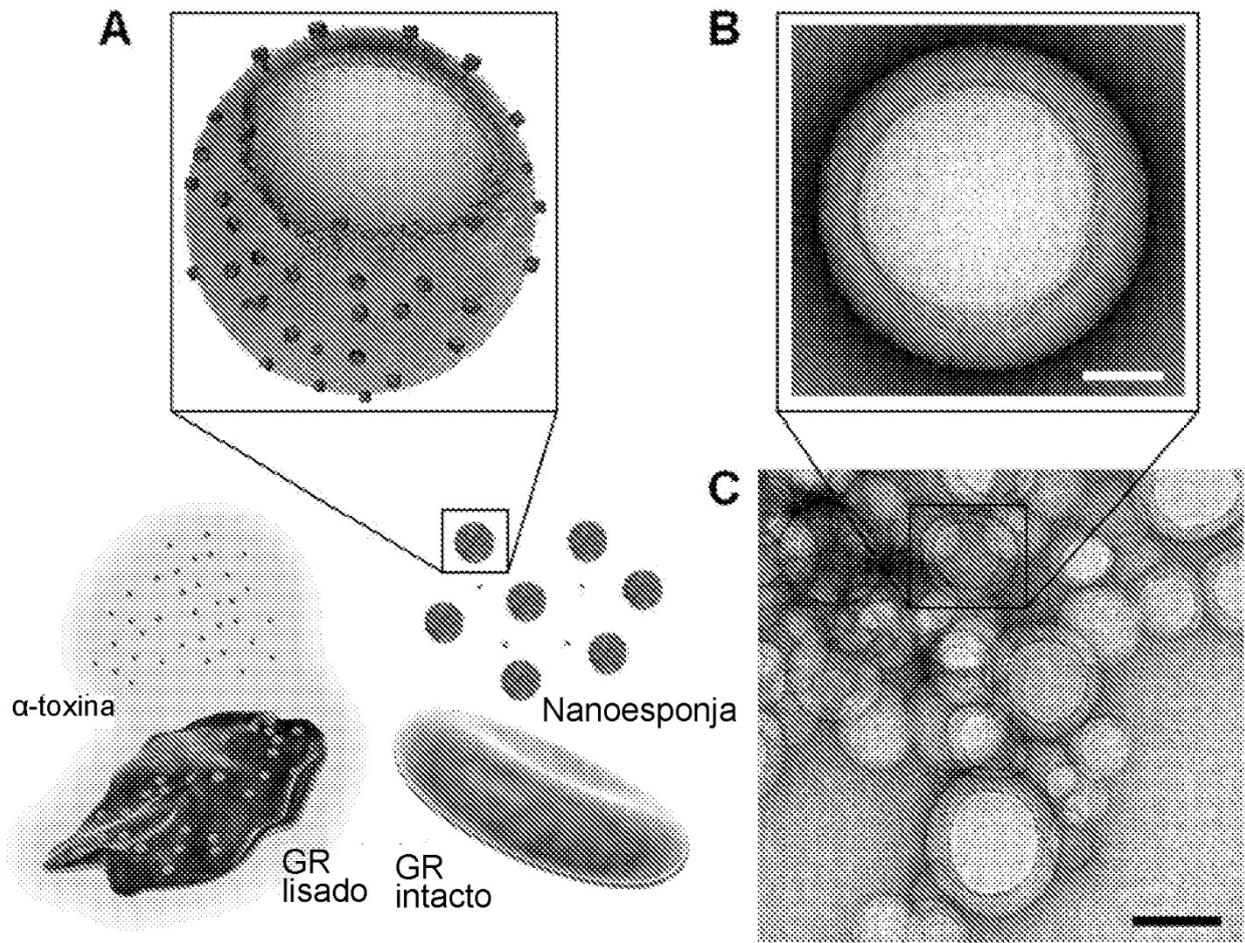


FIGURA 18

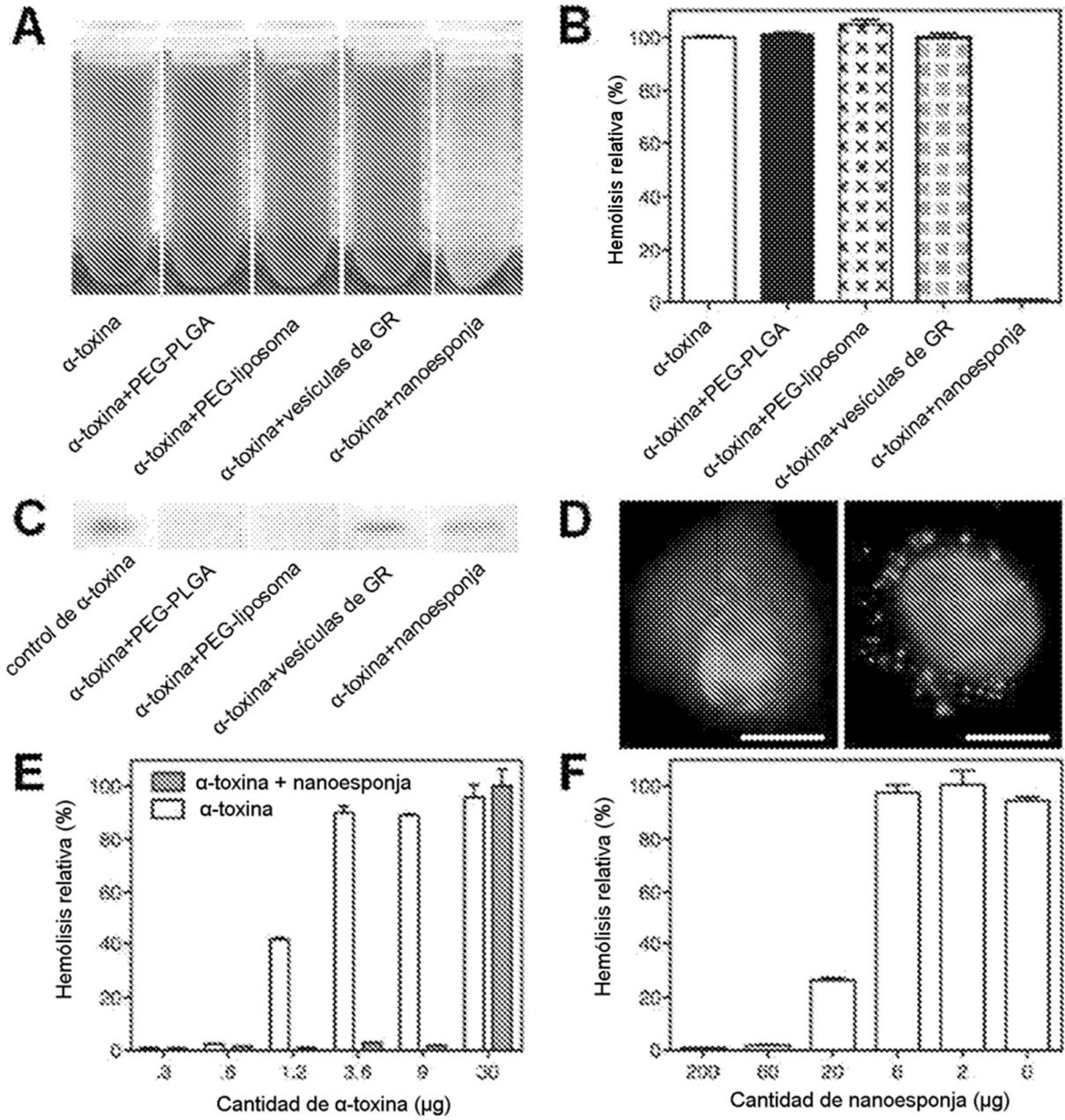


FIGURA 19

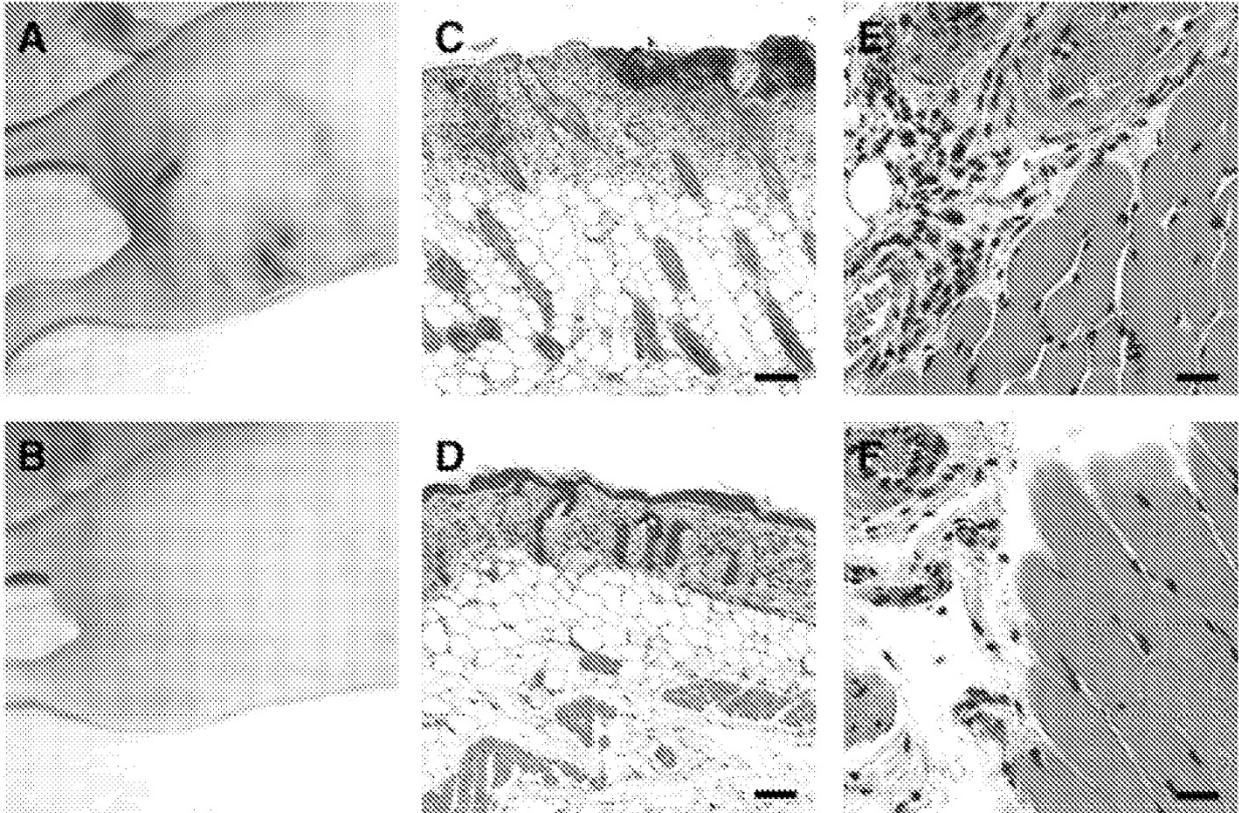


FIGURA 20

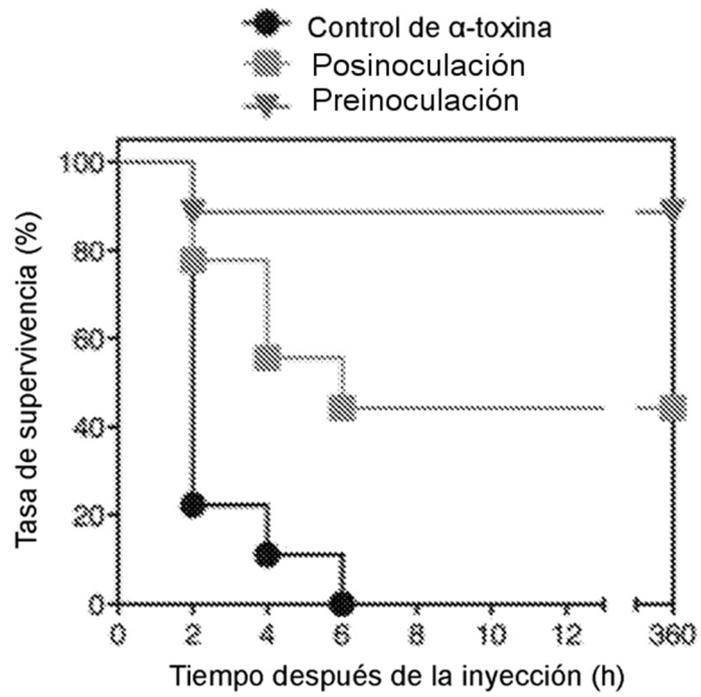


FIGURA 21

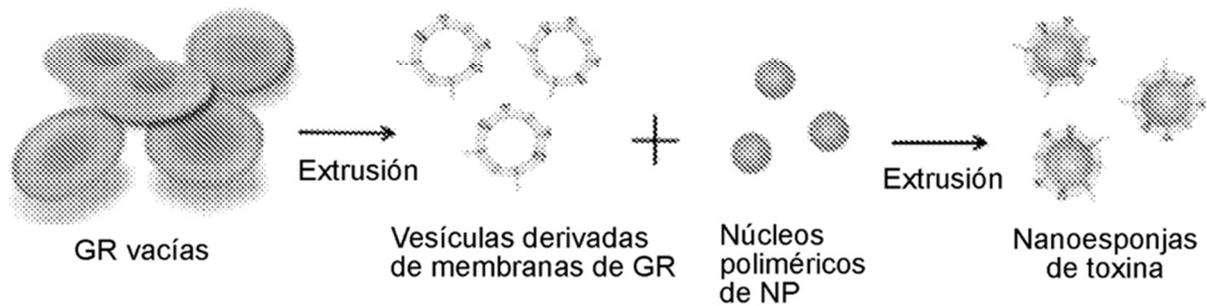


FIGURA 22

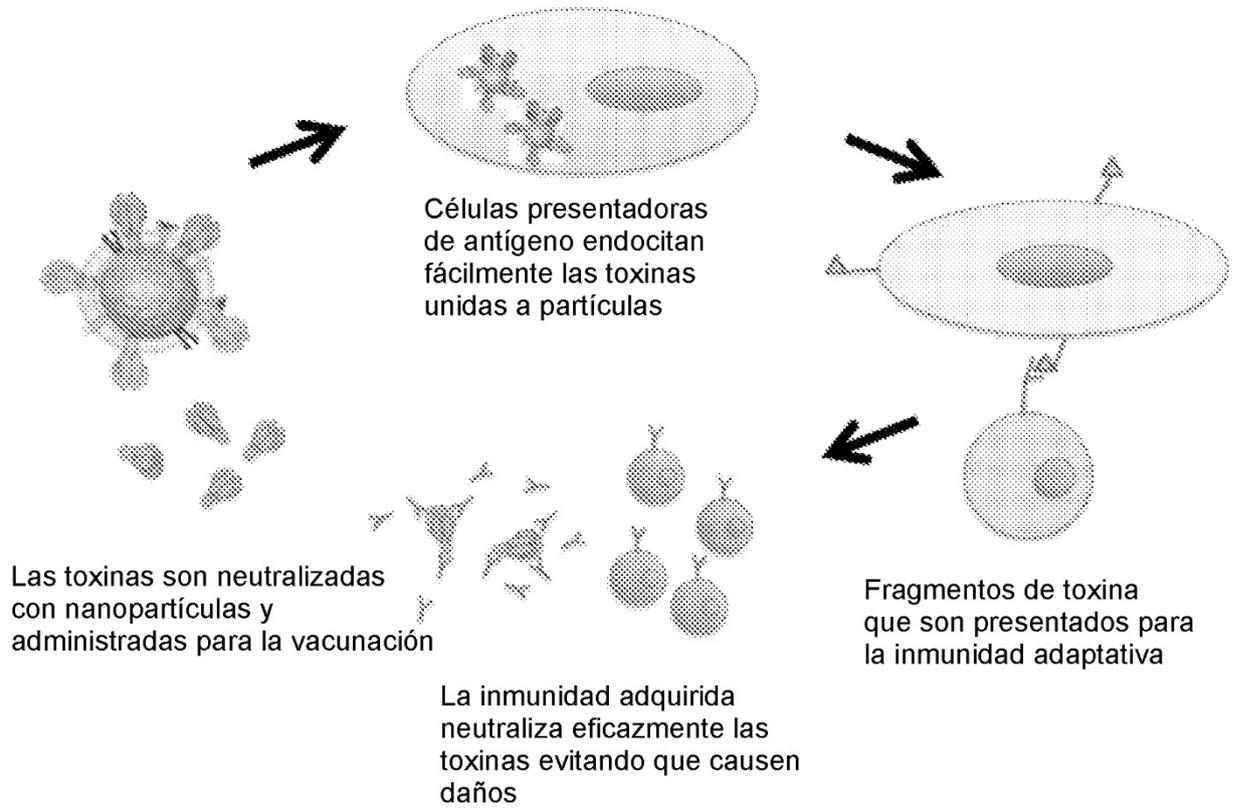


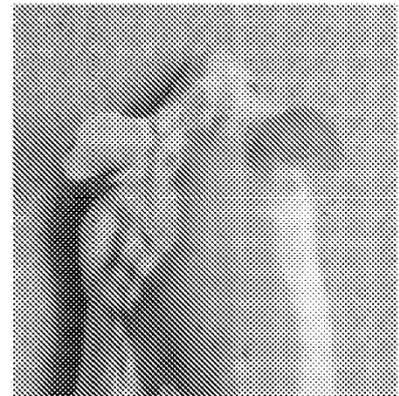
FIGURA 23



Toxina



Toxina desnaturalizada por calor



Toxina unida a nanopartícula

FIGURA 24

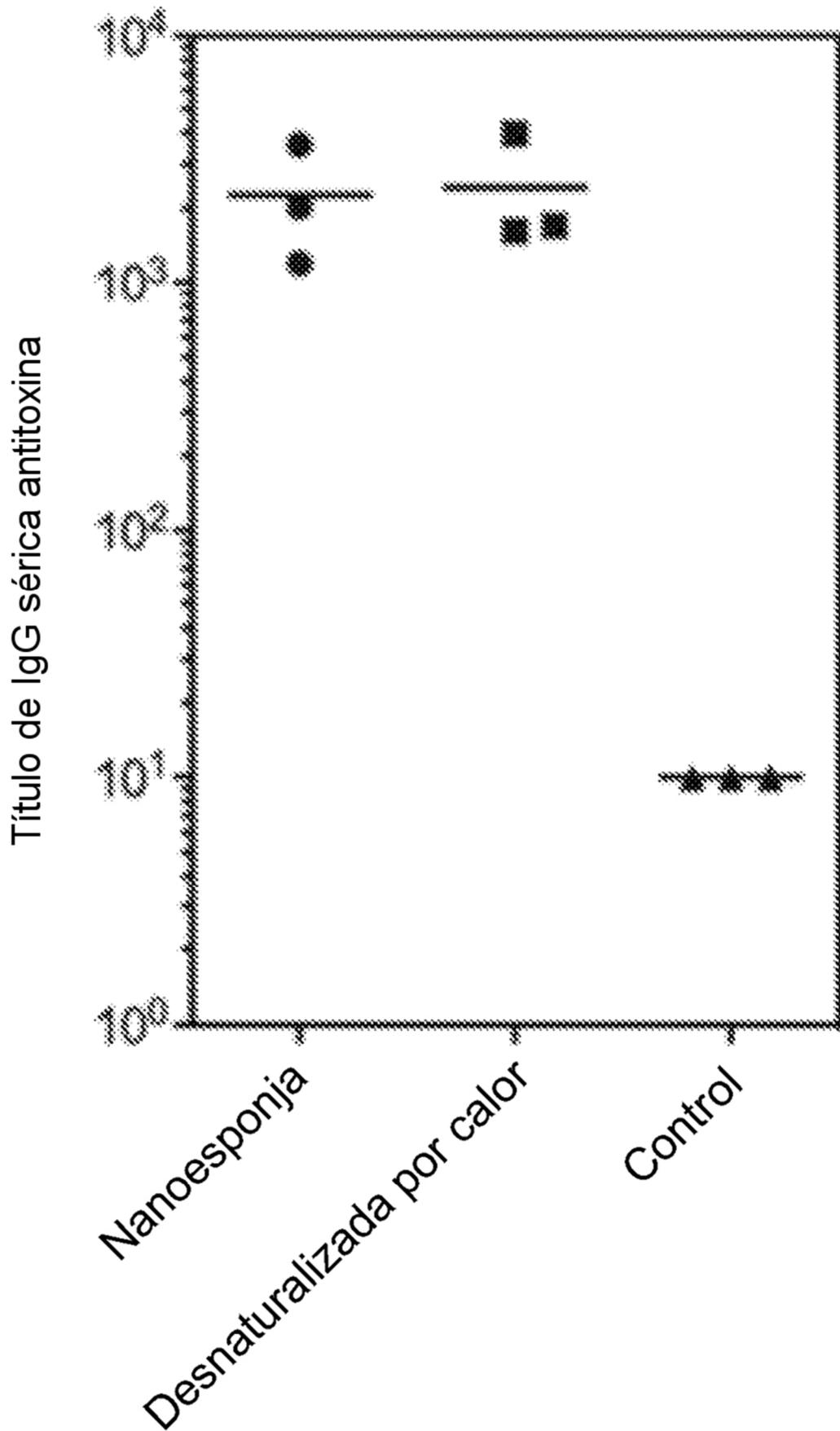


FIGURA 25

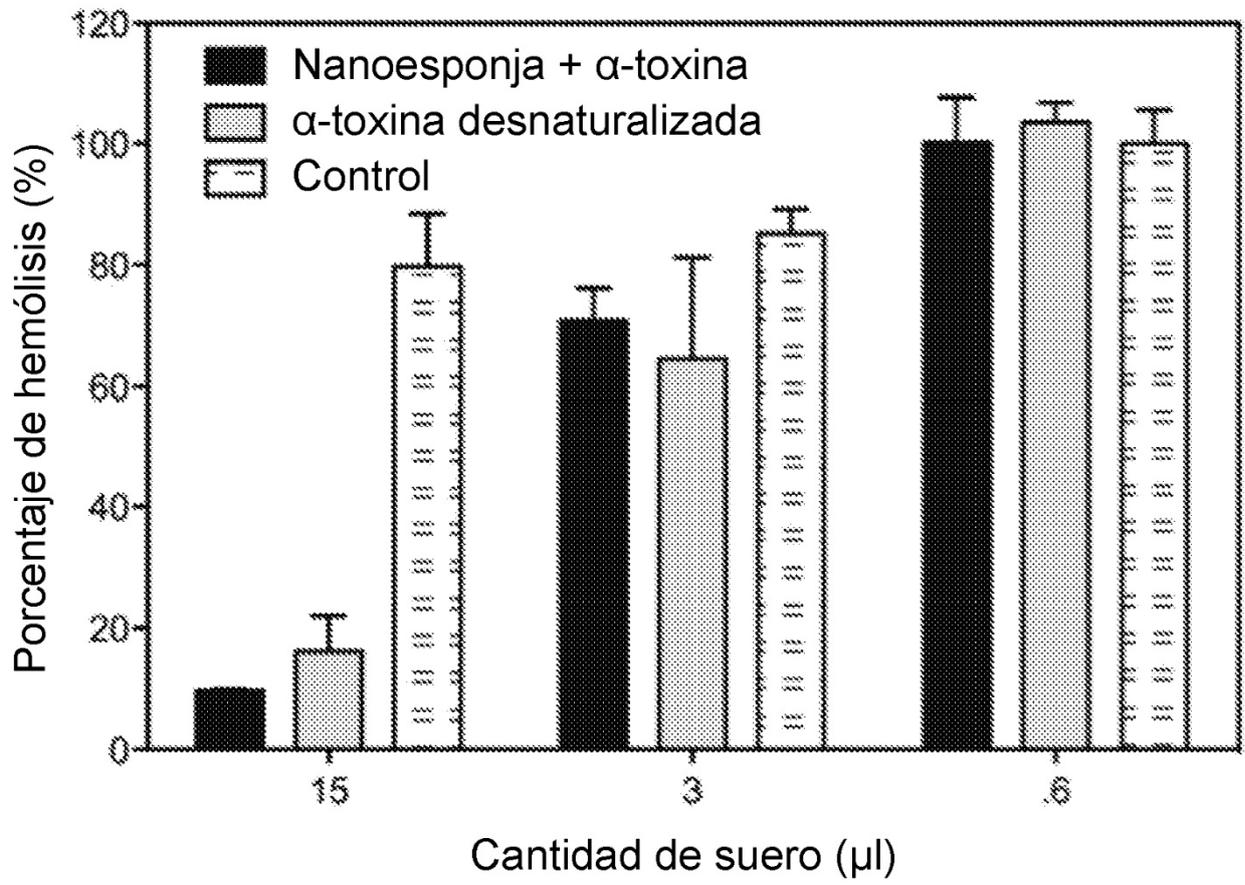


FIGURA 26

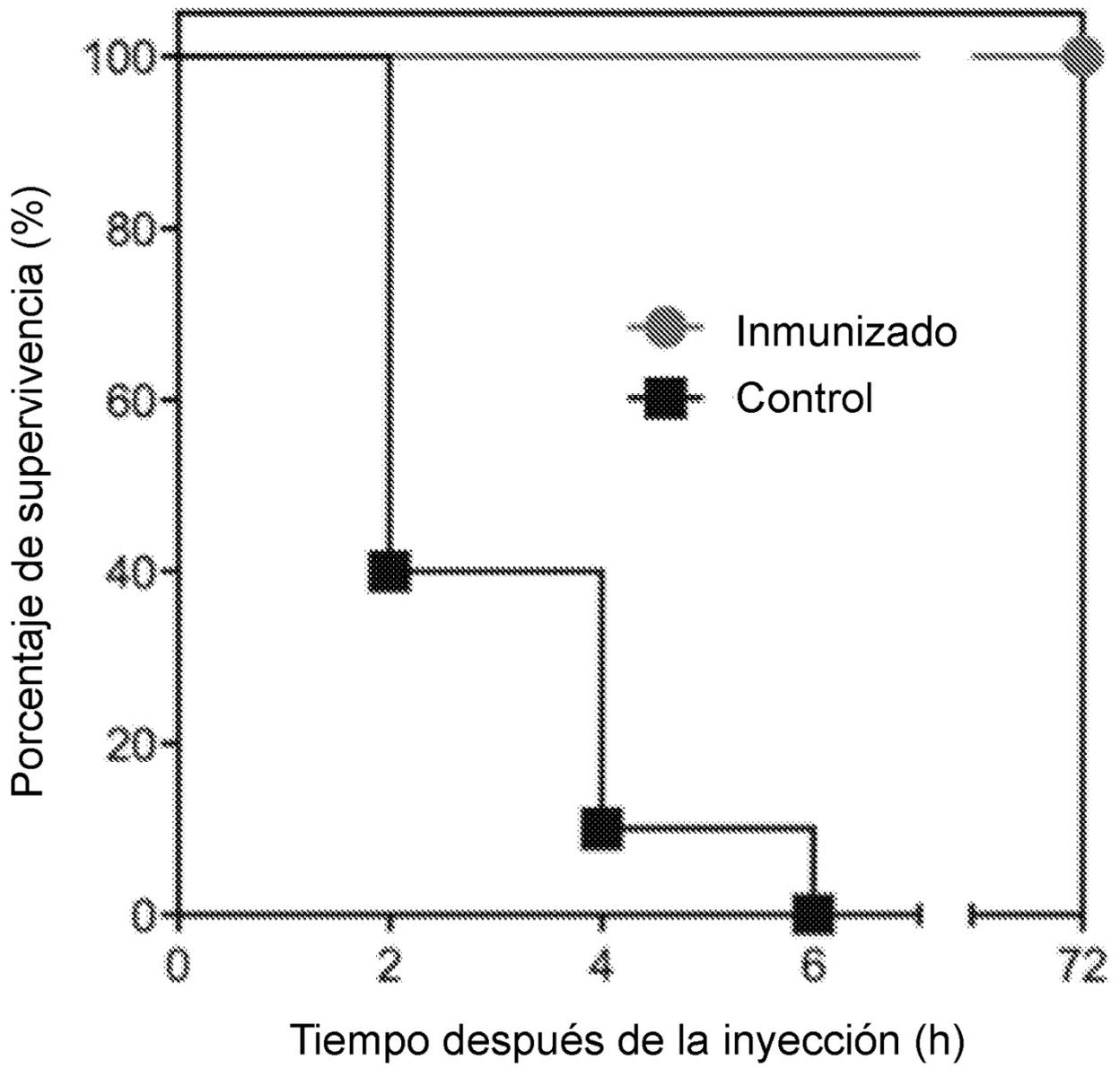
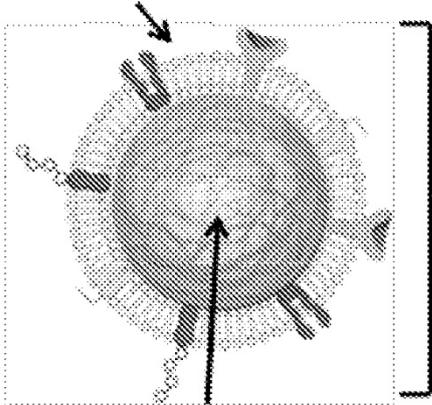


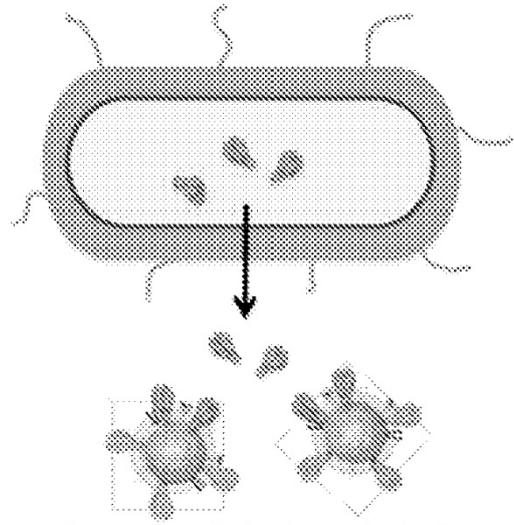
FIGURA 27

Membrana biomimética para absorber toxinas formadoras de poro



Tamaño sub-100 nm y recubrimiento con membrana de GR para la circulación prolongada

La partícula polimérica soporta la membrana bicapa y atrapa las toxinas



Secuestro de toxinas virulentas de microorganismos

FIGURA 28