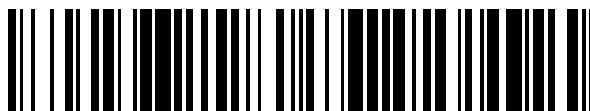


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 365**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/42** (2007.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2015 PCT/EP2015/077423**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16083331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2015 E 15801384 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3229843**

54 Título: **Composición farmacéutica, preparación y usos de la misma**

30 Prioridad:

**25.11.2014 EP 14306871**

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

**20.07.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEYRE, MARIE-EDITH;  
POTTIER, AGNÈS;  
GERMAIN, MATTHIEU;  
BERJAUD, CÉLINE y  
DARMON, AUDREY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

ES 2 774 365 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica, preparación y usos de la misma

**Campo de la invención**

5 La descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha partícula al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o  
 10 consistiendo en un oligómero de albúmina, y de (ii) al menos un compuesto de interés, típicamente al menos un compuesto farmacéutico, para administrar a un sujeto que necesita al menos dicho al menos un compuesto de interés, en donde al menos una nanopartícula potencia la eficiencia del al menos un compuesto de interés. La dimensión más grande o más larga de la nanopartícula biocompatible está típicamente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 500 nm.

15 La descripción también se refiere a una composición de este tipo para su uso en la administración de al menos un compuesto de interés en un sujeto que lo necesite, en el que la al menos una nanopartícula biocompatible y el al menos un compuesto de interés se administrarán secuencialmente en dicho sujeto, típicamente entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas uno del otro. La administración combinada, y típicamente secuencial, al sujeto de la al menos una nanopartícula biocompatible y del al menos un compuesto de interés mantiene, o incluso aumenta, el beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o de diagnóstico) de dicho al menos un compuesto de interés para una toxicidad reducida del mismo en dicho sujeto cuando se compara con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por dicho al menos un compuesto de interés cuando se administra a la dosis farmacéutica estándar en ausencia de cualquier nanopartícula biocompatible.

**20 Antecedentes**

Para garantizar la seguridad y la eficacia, se requiere que los compuestos farmacéuticos se suministren selectivamente a su sitio objetivo a una velocidad óptima en el sujeto que lo necesite. La farmacocinética (pK) es una rama de la farmacología dedicada a la determinación del destino de las sustancias administradas externamente a un organismo vivo. Esta determinación implica etapas para medir las concentraciones de compuesto en todos los tejidos principales durante un período de tiempo suficientemente largo, preferiblemente hasta la eliminación del compuesto. La farmacocinética es necesaria para describir eficientemente el comportamiento del compuesto *in vivo*, incluyendo los mecanismos de su absorción y distribución, así como sus cambios químicos en el organismo. El perfil de la pK en la sangre puede ajustarse utilizando varios programas para obtener parámetros clave de la pK que describen cuantitativamente cómo el cuerpo maneja el compuesto. Los parámetros importantes incluyen la concentración máxima ( $C_{max}$ ), la vida media ( $t_{1/2}$ ), el aclaramiento, el área bajo la curva (AUC) y el tiempo medio de residencia (MRT), es decir, el tiempo promedio durante el cual un compuesto permanece en un organismo. Cuando se observa una circulación sanguínea prolongada de la formulación del compuesto, generalmente se asocia a un aumento del  $t_{1/2}$ , un aclaramiento reducido, un aumento de AUC y un aumento de MRT. Los datos de la pK se utilizan a menudo para decidir la dosis óptima y el régimen de dosis para mantener la concentración sanguínea deseable con el fin de mejorar la eficacia de la terapéutica con efectos secundarios mínimos. Además, como bien es sabido por la persona experta, la concentración en sangre de un compuesto está correlacionada tanto con su eficacia como con su toxicidad en la mayoría de los casos, típicamente para fármacos libres.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) representan un segmento creciente de la línea de desarrollo en la industria farmacéutica. Muchas terapias proteicas, especialmente mAbs y derivados funcionales (proteínas de fusión, fragmentos, etc.), han sido aprobadas como fármacos en Estados Unidos, Europa y Japón durante los últimos 20 años. El número de mAbs en desarrollo también es grande con estimaciones de hasta 500 [Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani B M, Rose R H, CHetty M. Clin Pharmacokinet (2013) 52:83-124]. En humanos hay cinco subclases de inmunoglobulinas (Ig), IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que difieren con respecto a sus cadenas pesadas, pero comparten las mismas cadenas ligeras. IgG es la inmunoglobulina más predominante y representa el 70-80% del nivel sérico de inmunoglobulina total. Basado en la estructura interna y las diferencias antigénicas, la subclase IgG se puede dividir en cuatro grupos principales: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Las moléculas de IgG se construyen a partir de dos cadenas pesadas (~50 kDa) y dos cadenas ligeras (~25 kDa) unidas entre sí por una región bisagra de polipéptidos y una serie de puentes disulfuro que forman una proteína en forma de Y que consta de dos dominios Fab (fragmento de unión a antígeno) y un dominio Fc (fragmento cristalizante) (Véase Figura 1).

La región Fc está asociada con la vida media de eliminación de anticuerpos ( $t_{1/2}$ ), con moléculas de IgG intactas que tienen un  $t_{1/2}$  más largo que el fragmento Fab solo. El  $t_{1/2}$  promedio de IgG1, IgG2 e IgG4 es aproximadamente de 21 días; mientras que IgG3 tiene un  $t_{1/2}$  promedio de 7,1 días. Aunque una mayoría de los mAbs son selectivos en su unión al objetivo y se unen solo a sus objetivos específicos solubles o de la superficie celular, algunos mAbs pueden unirse a varios objetivos diferentes. La importancia de esta unión fuera del objetivo se puede ver de dos maneras diferentes: (1) como una contribución a la actividad primaria del fármaco; y (2) como una causa de los efectos adversos. Los mAbs circulantes largos pueden generar toxicidades normales no deseadas en los tejidos.

En el artículo "Improved tumor imaging and therapy via i.v. IgG-mediated time sequential modulation of neonatal receptor" de Jaggi J S et al. (The journal of clinical investigation. Vol. 117, nº9, 2007: 2422-2430), los autores recogen una estrategia terapéutica para alterar beneficiosamente la farmacocinética de los anticuerpos IgG mediante la inhibición farmacológica del receptor de Fr neonatal (FcRn) utilizando terapia de IgG en dosis altas con algún resultado positivo.

La solicitud de Patente internacional WO2014105644 describe una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que comprenden albúmina y paclitaxel. Se describe que la tecnología de nanopartículas basadas en albúmina ofrece la capacidad de mejorar la solubilidad de un fármaco al evitar la necesidad de disolventes tóxicos en el proceso de administración.

Aun así, como se desprende la técnica anterior y a pesar de una gran necesidad médica, la mejora de los compuestos (incluyendo los compuestos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico) que no se pueden utilizar de manera eficiente en pacientes debido a su toxicidad inaceptable o a sus parámetros farmacocinéticos desfavorables sigue siendo una preocupación.

### Descripción detallada

La presente invención permite ahora la optimización de la eficiencia de un compuesto de interés (en la presente memoria también identificado simplemente como "el compuesto" o como el "compuesto farmacéutico") cualquiera que sea su uso previsto en el contexto de terapia, profilaxis o diagnóstico. La composición descrita en la presente memoria que es una combinación de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o consistiendo en un oligómero de albúmina y de (ii) al menos un compuesto de interés, optimiza los parámetros farmacocinéticos del al menos un compuesto de interés y, como una consecuencia, ahora hace posible el desarrollo de compuestos terapéuticos que no podrían haberse desarrollado de otra manera debido típicamente a su toxicidad inaceptable. Típicamente, la nanopartícula biocompatible no se utiliza como un compuesto farmacéutico, es decir, como un compuesto terapéutico, profiláctico o de diagnóstico.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que una nanopartícula biocompatible que comprende al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o que consiste en un oligómero de albúmina reduce eficazmente las toxicidades no deseadas de los tejidos normales del anticuerpo(s) cuando dicho al menos un oligómero de albúmina y dicho anticuerpo(s) se administran secuencialmente, preferiblemente cuando dicho al menos un oligómero de albúmina se administra después del anticuerpo(s) en un sujeto que necesita dicho compuesto de anticuerpo.

Una composición típica descrita en la presente memoria (identificada generalmente en la presente memoria como "composición farmacéutica") es una composición que comprende la combinación de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o consistiendo en un oligómero de albúmina, y de (ii) al menos un compuesto ("el compuesto de interés"), en donde la dimensión más larga o más grande de la nanopartícula biocompatible está típicamente entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 500 nm.

Típicamente, la relación entre (al menos una) nanopartículas biocompatibles y compuestos de interés está entre 0,1/1 y 1000/1 o 0,5/1 y 1000/1, preferiblemente entre 0,5/1 y 500/1, incluso más preferiblemente entre 0,5/1 y 300/1.

Un objeto descrito en la presente memoria es una composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o consistiendo en un oligómero de albúmina, y de (ii) al menos un compuesto farmacéutico, en donde la dimensión más larga o más grande de la al menos una nanopartícula biocompatible está entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 500 nm, para su uso en la administración de al menos un compuesto farmacéutico en un sujeto que lo necesita, en donde la al menos una nanopartícula y el al menos un compuesto farmacéutico se deben administrar en un sujeto que necesita dicho al menos un compuesto farmacéutico, entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas uno del otro, y en donde la nanopartícula biocompatible no se utiliza como un compuesto farmacéutico.

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de" cuando se asocian a un valor tal como por ejemplo el tamaño de una nanopartícula o un intervalo de tiempo, indican que una variación con el valor indicado, que la persona experta reconocería como una variación pequeña, no afecta sustancialmente las propiedades del tema en cuestión al que está asociada y que dicho tema en cuestión permanece en el espíritu de la invención reivindicada.

La administración combinada al sujeto de la al menos una nanopartícula biocompatible y del al menos un compuesto de interés, a través de la composición de la invención, permite típicamente (mantiene) el mismo beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o de diagnóstico) del al menos un compuesto de interés para una toxicidad reducida del mismo para el sujeto, o aumenta el beneficio farmacéutico del al menos un compuesto de interés para una toxicidad reducida del mismo para el sujeto, cuando se compara con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por la dosis farmacéutica estándar de dicho al menos un compuesto de interés en ausencia de cualquier nanopartícula biocompatible.

Como la forma de la partícula puede influir en su “biocompatibilidad”, se prefieren aquí partículas que tienen una forma bastante homogénea. Por razones farmacocinéticas, se prefieren, por lo tanto, las nanopartículas que son esencialmente esféricas/redondas u ovoides. Tal forma también favorece la interacción de nanopartículas con o la absorción por las células. Se prefiere particularmente la forma esférica/redonda.

- 5 En el espíritu de la invención, el término “nanopartícula” se refiere a un producto, con un tamaño en el rango de nanómetros, típicamente entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm, preferiblemente entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 500 nm, entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 400 nm, aproximadamente 30 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente 20 nm y aproximadamente 300 nm, aproximadamente 10 nm y aproximadamente 300 nm, por ejemplo entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 100 nm, por ejemplo entre aproximadamente 10 nm, 15 nm o 20 nm y aproximadamente 100 nm, 200 nm, o 300 nm.

- 10 Los términos “tamaño de la nanopartícula”, “tamaño más grande de la nanopartícula” y “tamaño más largo de la nanopartícula” se refieren típicamente en la presente memoria a la “dimensión más grande o más larga de la nanopartícula” o “diámetro de la nanopartícula” cuando es de forma esférica/redonda u ovoide. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) o Cryo-TEM se puede utilizar para medir el tamaño de la nanopartícula. Además, la dispersión dinámica de luz (DLS) se puede utilizar para medir el diámetro hidrodinámico de nanopartículas en disolución. Estos dos métodos se pueden utilizar, además, uno después del otro para comparar el diámetro hidrodinámico de una nanopartícula medida por DLS con el tamaño de dicha partícula medida por TEM o Cryo-TEM, para confirmar dicho tamaño. Un método preferido es DLS (Ref. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis – Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008).

- 15 20 La carga superficial de una nanopartícula se puede modular y se determina típicamente mediante mediciones de potencial zeta en medio acuoso para una concentración de nanopartículas entre 0,2 y 10 g/L, para un pH entre 6 y 8, y típicamente para concentraciones de electrolitos en el medio acuoso entre 0,001 y 0,2 M, por ejemplo 0,01 M o 0,15 M.

- 25 Típicamente, la nanopartícula biocompatible descrita en la presente memoria tiene una carga superficial electrostática de al menos |10 mV|, es decir, inferior a -10 mV o superior a +10 mV, por ejemplo, inferior entre -12 mV o -15 mV y -20 mV o superior entre +12 mV o +15 mV y +20 mV, típicamente inferior a -15 mV o superior a +15 mV. Preferiblemente, la nanopartícula biocompatible descrita en la presente memoria tiene un valor absoluto de carga superficial electrostática (“valor absoluto de carga superficial”) de más de 10 mV, siendo dicha carga incluso más preferiblemente una carga negativa.

- 30 La al menos una nanopartícula biocompatible de la invención comprende al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ), por ejemplo, un dímero ( $n = 2$ ) o un trímero ( $n = 3$ ) de monómeros de albúmina o un oligómero de albúmina que comprende al menos cuatro monómeros de albúmina ( $n \geq 4$ ), o que consiste en un oligómero de albúmina (véase Figura 2). El al menos un oligómero de albúmina comprende típicamente a lo sumo 50 monómeros de albúmina, preferiblemente menos de 50 monómeros de albúmina, por ejemplo, 30 monómeros de albúmina, preferiblemente menos de 25 monómeros de albúmina, por ejemplo 20 monómeros de albúmina.

- 35 Los monómeros de albúmina se conjugan típicamente unos con otros para formar un oligómero de albúmina mediante la interacción directa o mediante un enlazador.

- 40 La molécula de albúmina lleva varios grupos funcionales que se pueden utilizar para modificar su reactividad y/o reticular múltiples moléculas de albúmina juntas [es decir, formación de dímeros ( $n = 2$ ) u oligómeros de más de dos monómeros de albúmina ( $n > 2$ )]. La mayoría de las veces, la reacción de reticulación consiste en una sustitución nucleofílica. La estrategia de reticulación puede implicar por tanto una etapa de “activación” de la albúmina, que consiste en aumentar la reactividad de la molécula de albúmina mediante el injerto de grupos reactivos adicionales, utilizando un reactivo [que implica un grupo de interés tal como un grupo nucleófilo, es decir, un grupo que reacciona con átomos cargados positivamente (o parcialmente positivos), o un grupo saliente, es decir, un fragmento molecular que sale con un par de electrones en la ruptura del enlace heterolítico], en la molécula de albúmina. La reacción de reticulación puede producirse (1) en la molécula de albúmina mediante el acoplamiento/reticulación de sus grupos funcionales disponibles (amina primaria, ácido carboxílico o tiol) con un enlazador reactivo (típicamente con un enlazador “corto” que tiene una cadena molecular que comprende menos de 20 átomos, o con un enlazador “largo” que tiene una cadena molecular que comprende más de 20 átomos); (2) en la albúmina “activada”, con o sin enlazador.

- 45 50 La Tabla 1 proporciona ejemplos no exhaustivos de estrategias utilizables para injertar grupos reactivos en la molécula de albúmina (etapa de “activación”). Es de destacar que cualquier molécula con nucleófilos apropiados o grupos salientes puede estar involucrada en esta etapa de “activación”.

- 55 La Tabla 2 proporciona ejemplos no exhaustivos de estrategias utilizables para crear un enlace covalente entre dos moléculas de albúmina (etapa de “reticulación”).

Tabla 1: Activación de moléculas de albúmina

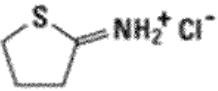
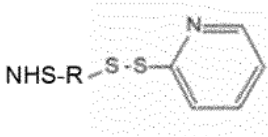
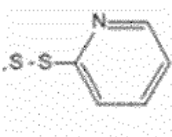
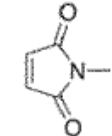
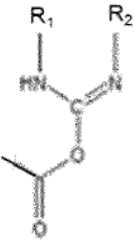
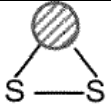
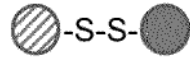
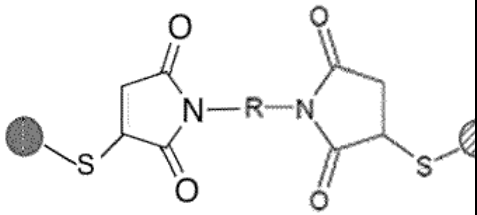

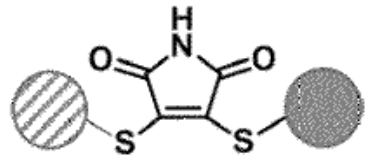
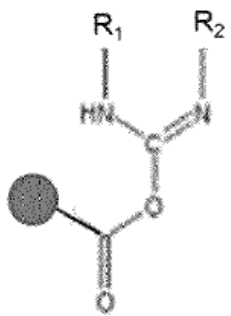
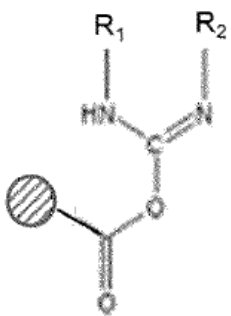
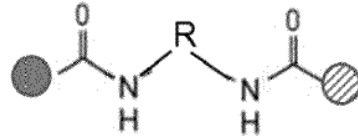
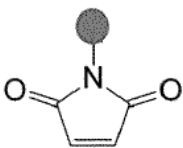
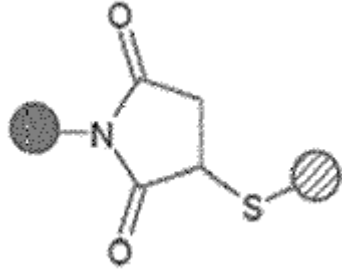
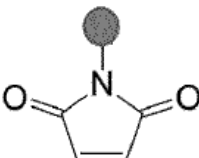
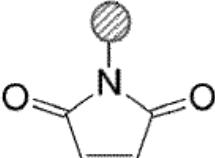
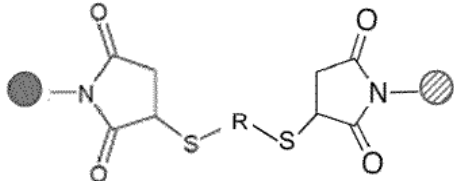


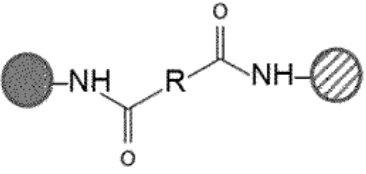


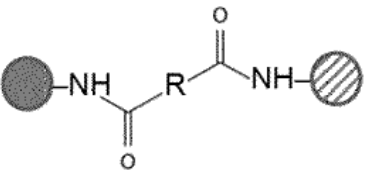


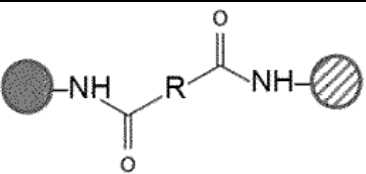
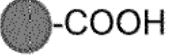
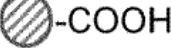
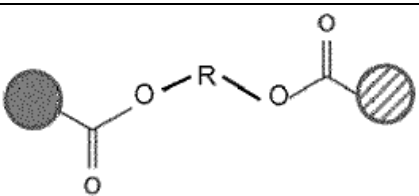
Grupo objetivo en la molécula de albúmina	Grupo de reactivos	Ejemplo de reactivo	Grupos reactivos injertados en albúmina
-S-S-	HS-R-SH	Ditiotreitol, poli(etilenglicol)ditiol	-SH
-NH <sub>2</sub>		2-iminothiolano	-SH
-NH <sub>2</sub>	O=C-R-C=O + H <sub>2</sub> N-R <sub>1</sub> -S-S-R <sub>2</sub> - NH <sub>2</sub>	Glutaraldehído + cistamina	-SH
-NH <sub>2</sub>	O=C-R-C=O + HS-R <sub>1</sub> -NH <sub>2</sub>	Glutaraldehído + cisteamina	-SH
-COOH	R <sub>1</sub> -N=C=N-R <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> N-R <sub>1</sub> -S-S-R <sub>2</sub> - NH <sub>2</sub>	Etilendiaminocarbodiimida + cistamina	-SH
-COOH	R <sub>1</sub> -N=C=N-R <sub>2</sub> + HS-R <sub>1</sub> -NH <sub>2</sub>	Etilendiaminocarbodiimida + cisteamina	-SH
-COOH	R <sub>1</sub> -N=C=N-R <sub>2</sub> + HOOC-R <sub>1</sub> (NH <sub>2</sub> )- R <sub>2</sub> (SH)	Etilendiaminocarbodiimida + cisteína	-SH
-NH <sub>2</sub>		Disulfuro de <i>N</i> - hidroxisuccinimida- poli(etilenglicol)-orto- piridilo (NHS-PEG-OPSS)	
-NH <sub>2</sub>	X-R-COO-Y, donde X = maleimida y Y = <i>N</i> - hidroxisuccinimida	<i>N</i> -hidroxisuccinimida éster del ácido 4- maleimidobutírico	
-COOH	R <sub>1</sub> -N=C=N-R <sub>2</sub>	etilendiaminocarbodiimida	

Tabla 2: reticulación de moléculas de albúmina para formar oligómeros ( $n \geq 2$ ) de albúmina (● y ● representan monómeros de albúmina)

Molécula 1	Tipo de enlazador	Molécula 2	Enlace covalente
●-SH	-		
●-SH	X-R-X, donde X = maleimida	●-SH	
●-SH	Dibromo maleimida 	●-SH	
	X-R-X, donde X = amina primaria		
	-	●-SH	
	X-R-X, donde X = tiol		

	X-R-X, donde X = ácido carboxílico, en presencia de EDC		
	X-OOC-R-COO-X, donde X = N-hidroxisuccinimida		
	X-OOC-R-COO-X, donde X = sulfo-N-hidroxisulfosuccinimida		
	X-R-X, donde X = alcohol		

Los oligómeros ( $n \geq 2$ ) de albúmina por conjugación directa de monómeros de albúmina (véase Figura 2 a, d y g) pueden por ejemplo sintetizarse de la siguiente manera:

5 • etapa de activación (etapa opcional): la molécula/monómero de albúmina se puede tiolar utilizando ditioneitol (DDT) que reacciona con el enlace disulfuro de dicha molécula/monómero de albúmina.

• etapa de reticulación o conjugación: los enlaces disulfuro se forman entre varias moléculas/monómeros de albúmina tiolada y/o entre moléculas/monómeros de albúmina tiolada o no tiolada dando como resultado oligómeros de albúmina.

10 Los oligómeros ( $n \geq 2$ ) de albúmina por conjugación de monómeros de albúmina mediante un enlazador (en el siguiente ejemplo el enlazador es o un enlazador "corto" o un enlazador "largo") (véase Figura 2 b, e, h, y c, f, i, m, n) se pueden por ejemplo sintetizar de la siguiente manera:

• etapa de activación (etapa opcional):

La molécula de albúmina se puede tiolar típicamente mediante un iminotiolano, o utilizando un enlazador  $X-R_1-SH$  o  $XR_1-S-S-R_2X$ , en donde:

15 - X es un grupo funcional que reacciona con la amina primaria o el grupo carboxílico de la molécula de albúmina en presencia o no de típicamente glutaraldehído o etilendiaminocarbodiimida (EDC),

-  $R_1$  o  $R_2$  es una cadena molecular que comprende menos de 20 átomos (enlazador "corto") o más de 20 átomos (enlazador "largo"), y  $R_1$  y  $R_2$  son idénticos o diferentes cuando se injertan en la molécula de albúmina.

20 Ejemplos de enlazadores son etilendiaminocarbodiimida (EDC) y cisteína, EDC y cistamina, glutaraldehído y cistamina.

La molécula de albúmina se puede funcionalizar con grupos maleimida utilizando un enlazador X-R-Y en donde:

- X es un grupo maleimida,

- R es una cadena molecular con menos de 20 átomos (enlazador "corto") o más de 20 átomos (enlazador "largo"),

- Y es un grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) o un grupo sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfoNHS).

Ejemplos de enlazadores son el N-hidroxisuccinimida éster del ácido 4-maleimidobutírico.

5 • Etapa de reticulación o conjugación: típicamente, las moléculas de albúmina, moléculas de albúmina tioladas y/o moléculas de albúmina funcionalizadas con maleimida se pueden reticular o conjugar juntas, con o sin un enlazador para formar oligómeros de albúmina. Enlazadores típicos para utilizarse para formar oligómeros de albúmina se presentan en la Tabla 2. Los ejemplos de enlazadores que pueden reticular moléculas de albúmina tioladas son reticuladores que comprenden al menos un grupo maleimida y puede ser por ejemplo un reticulador de bismaleimida tal como bis(maleimido)etano, 1,4-bis(maleimido)butano, 1,6-bis(maleimido)hexano, o 4arm-poli(etilenglicol)-maleimida, típicamente 4arm-poli(etilenglicol)-maleimida 11kDa.

10 La asociación de monómeros y/o oligómeros de albúmina puede producirse mediante enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas (véase Figura 2j, k y l).

15 La desolvatación de moléculas de albúmina y/o de oligómeros de albúmina al cambiar la polaridad del medio, es decir, al añadir, por ejemplo, diferentes volúmenes de etanol o acetona a una disolución acuosa de moléculas de albúmina y/o de oligómeros de albúmina, conduce a la formación de nanopartículas más grandes de albúmina (véase Figura 2 o). Esas nanopartículas más grandes de albúmina pueden además reticularse entre sí utilizando típicamente glutaraldehído.

20 La administración combinada de la nanopartícula(s) biocompatible junto con el al menos un compuesto de interés mantiene, preferiblemente aumenta, el beneficio farmacéutico (es decir, terapéutico, profiláctico o de diagnóstico), típicamente terapéutico, de el al menos un compuesto de interés para una toxicidad reducida del mismo para el sujeto, típicamente cuando se administra en el sujeto con necesidad del al menos un compuesto de interés, entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas uno del otro, en comparación con el beneficio farmacéutico y la toxicidad inducida por la dosis farmacéutica estándar, típicamente terapéutica, de dicho al menos un compuesto de interés en ausencia de cualquier nanopartícula biocompatible.

25 En una realización particular, la al menos una nanopartícula biocompatible se administra con varios compuestos de interés, típicamente dos compuestos de interés.

30 Se pueden utilizar diferentes moléculas o agentes según la presente enseñanza como el compuesto de interés, típicamente como el al menos un compuesto farmacéutico de interés, administrado en combinación con al menos una nanopartícula biocompatible como se describió anteriormente. Este compuesto puede ser un compuesto terapéutico, profiláctico o de diagnóstico como se explicó anteriormente. Típicamente es un compuesto conocido por la persona experta como más o menos tóxico para un ser humano. El compuesto de interés puede estar radiomarcado.

35 El compuesto de interés es típicamente un compuesto farmacéutico (terapéutico o de diagnóstico), y en particular un anticuerpo o un compuesto farmacéutico que comprende o consiste en al menos un anticuerpo, por ejemplo, una combinación de al menos dos anticuerpos o tres anticuerpos. El anticuerpo se puede seleccionar por ejemplo de un anticuerpo monoclonal (mAb), un conjugado de anticuerpo-fármaco (que consiste en un agente citotóxico unido al mAb mediante un enlazador químico), un anticuerpo manipulado, típicamente un mAb glicomanipulado y un anticuerpo multiespecífico.

40 Un compuesto de interés preferido es un compuesto basado en IgG, es decir, un compuesto que comprende todo o una parte de un IgG, o una combinación de compuestos basados en IgG. El compuesto de interés basado en IgG puede seleccionarse por ejemplo de Abatacept (proteína de fusión), Abciximab (Fab de IgG1 quimérico), adalimumab (IgG1 humano), Aflibercept (proteína de fusión), Alefacept (proteína de fusión), Alemtuzumab (IgG1 humanizado), Basiliximab (IgG1 quimérico), Belimumab (IgG1 humano), Bevacizumab (IgG1 humanizado), Brentuximab (IgG1 quimérico), canakinumab (IgG1 humano), Certolizumab pegol (fragmento de Fab humanizado), Cetuximab (IgG1 humano/murino quimérico), Daclizumab (IgG1 humanizado), Denosumab (IgG2 humano), Eculizumab (IgG2/4 humanizado), Efalizumab (IgG1 humanizado), Etanercept (proteína de fusión), Gemtuzumab (IgG1 humano/murino quimérico), Golimumab (IgG1 humano), Infliximab (IgG1 humano/murino quimérico), Ipilimumab (IgG1 humano), Natalizumab (IgG4 humanizado), Ofatumumab (IgG1 humano), Omalizumab (IgG1 humanizado), Palivizumab (IgG1 humanizado), Panitumumab (IgG2 humanizado), Ranitumumab (Fab de IgG1 humanizado), Rituximab (IgG1 quimérico), Tocilizumab (IgG1 humanizado), Trastuzumab (IgG1 humanizado), Ustekinumab (IgG1 humano), y cualquier otro anticuerpo de interés conocido por el médico como útil para prevenir o tratar una enfermedad como se identifica en la presente memoria.

55 La composición farmacéutica de la invención como se reivindica se puede utilizar en muchos campos, en particular en medicina humana y veterinaria. Esta composición es típicamente para su uso en un animal, preferiblemente un mamífero (por ejemplo, en el contexto de la medicina veterinaria), incluso más preferiblemente en un ser humano cualquiera que sea su edad o sexo.



Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno seleccionado de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del sistema nervioso central (CNS), una enfermedad gastrointestinal, un trastorno genético, un trastorno hematológico, un trastorno hormonal, un trastorno del sistema inmune, una enfermedad infecciosa, un trastorno metabólico, un trastorno muscoesquelético, un cáncer, una enfermedad respiratoria, una intoxicación, etc. En una realización preferida, la composición farmacéutica es para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del CNS, un cáncer, una enfermedad infecciosa y un trastorno metabólico.

En el contexto de la presente invención, la al menos una nanopartícula biocompatible y el al menos un compuesto de interés son ventajosos para ser administrados en un sujeto que necesita dicho compuesto de interés, entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas uno del otro, típicamente entre más de 5 minutos y aproximadamente 48 horas, preferiblemente entre más de 4 horas y aproximadamente 48 horas, por ejemplo, entre más de 4 horas y aproximadamente 24 horas, para optimizar la eficacia del al menos un compuesto farmacéutico.

También se describe en la presente memoria un método para tratar un sujeto que sufre de una enfermedad tal como la mencionada en la presente memoria, en donde dicho método comprende administrar a dicho sujeto una composición farmacéutica como se describe en la presente memoria, típicamente al menos una nanopartícula biocompatible y al menos un compuesto de interés como se describe en la presente memoria. Cualquiera de las al menos una nanopartícula biocompatible o al menos un compuesto de interés se puede administrar primero al sujeto siempre que se administren la nanopartícula biocompatible y el compuesto entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas uno del otro o según cualquier otro programa descrito en la presente memoria. Preferiblemente el al menos un compuesto de interés se administra primero al sujeto (o, en otras palabras, la al menos una nanopartícula biocompatible se administra después del al menos un compuesto de interés). La administración de cualquiera de dichos al menos una nanopartícula o al menos un compuesto de interés puede ser una única administración de cada, administraciones repetidas de cada, por ejemplo, varias administraciones consecutivas de cada. La al menos una nanopartícula biocompatible se puede administrar una vez y el al menos un compuesto de interés se puede administrar más de una vez o viceversa.

En un aspecto particular, la al menos una nanopartícula biocompatible es administrada al menos al comienzo de un protocolo que comprende varias administraciones del al menos un compuesto de interés, es decir, al menos en la primera administración de dicho al menos un compuesto de interés y antes o preferiblemente después de la administración de dicho al menos un compuesto de interés.

En otro aspecto particular, la al menos una nanopartícula biocompatible no se administra al comienzo de un protocolo que comprende varias administraciones del al menos un compuesto de interés y no se administra antes de la segunda o tercera administración de dicho al menos un compuesto de interés, y antes o preferiblemente después de la administración de dicho al menos un compuesto de interés.

En el contexto de estos dos últimos aspectos, la al menos una nanopartícula biocompatible también se puede administrar junto (antes o preferiblemente después como se explicó anteriormente) con el al menos un compuesto de interés durante parte o todas las administraciones siguientes de dicho al menos un compuesto de interés.

La nanopartícula(s) biocompatible de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede administrar por diferentes vías tales como subcutánea, intravenosa (IV), intra-dérmica, intra arterial, vías respiratorias (inhalación), intra peritoneal, intra muscular y/o vía oral (*per os*). Vías preferidas son intravenosa (IV), intra arterial, y/o intra peritoneal.

El compuesto(s) de interés de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede administrar por diferentes vías tales como subcutánea, intravenosa (IV), intra dérmica, intra arterial, vías respiratorias (inhalación), intra peritoneal, intra muscular y/o vía oral (*per os*).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

#### 45 Leyenda de las Figuras

Figura 1: Estructura de las moléculas de IgG [Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani B M, Rose R H, CHetty M. Clin Pharmacokinet (2013) 52:83-124]

Figura 2: Representación de la al menos una nanopartícula biocompatible que comprende, o consiste en, al menos un dímero de albúmina (a/ b/ c/ - n=2) o un oligómero de albúmina (d/ e/ f/ g/ h/ i/ j/ k/ l/ m/ n/ o, n>2)

Figura 3: electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente con

(a) una suspensión de albúmina de suero de ratón (MSA), es decir, una suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1;

(b) una suspensión de MSA preparada según el ejemplo 1, es decir, una suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2; y

(c) Proteína HiMark estándar 31-460 kDa.

5 Figura 4: imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas biocompatibles que comprenden al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o consisten en un oligómero de albúmina, con un tamaño de partícula medio típicamente superior a 50 nm (barra de escala 500 nm)

10 Figura 5: representación esquemática del programa de tratamiento para la composición farmacéutica que comprende (i) las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 (es decir, la suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1 o la suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2) y (ii) el compuesto DC101 en los xenoinjertos FaDu.

Figura 6: retraso en el crecimiento tumoral de la composición farmacéutica que comprende las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y el compuesto DC101 en los xenoinjertos FaDu (RTV  $\pm$  SD medio).

Figura 7: electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente con

15 (a) una suspensión de albúmina de suero de ratón (MSA), es decir, una suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1 (véase Ejemplo 2);

(b) una suspensión de MSA preparada según el Ejemplo 1, es decir, una suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2 (véase Ejemplo 2);

(c) una suspensión de MSA preparada según el Ejemplo 6, es decir, una suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 3 (véase Ejemplo 7); y

20 (d) Proteína HiMark estándar 31-460 kDa.

### Ejemplos

Ejemplo 1: síntesis de la al menos una nanopartícula biocompatible que consiste en al menos un oligómero ( $n \geq 2$ ) de albúmina, por ejemplo, un dímero ( $n = 2$ ) de albúmina, con un tamaño de partícula medio típicamente inferior a 50 nm.

25 La albúmina de suero de ratón (1 g) se disolvió en 77 mL de tampón fosfato de sodio 100 mM (PBS) pH 8,5. La disolución se mezcló con 77 mL de una disolución acuosa reciente de 2-iminotiolano (reactivo) (3 mM). Después de ajustar el pH a 8,5 con una disolución de hidróxido de sodio (NaOH), la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas.

30 Después, la suspensión resultante se diluyó en tampón fosfato y se ajustó a pH 7,3. Se llevó a cabo la eliminación del exceso de reactivo y se logró una nueva concentración de la suspensión a medida que se prepara utilizando una membrana de polietersulfona (50 kDa). La concentración final de la albúmina se determinó utilizando el método Bradford y se encontró igual a aproximadamente 65 g/L.

Ejemplo 2: Caracterización de la al menos una nanopartícula biocompatible que consiste en un oligómero de albúmina, por ejemplo, un dímero ( $n = 2$ ) de albúmina en la suspensión del Ejemplo 1.

35 - La presencia de nanopartículas que consisten en al menos un oligómero de albúmina se analizó mediante electroforesis. 7,5  $\mu$ L de suspensión de albúmina de suero de ratón (MSA) (0,5 g/L de albúmina), o de suspensión del Ejemplo 1 (0,5 g/L de albúmina) se mezclaron con 2,5  $\mu$ L de una disolución de tampón de carga de muestra (4X) de dodecil sulfato de litio (LDS). Se colocó un gel de poliacrilamida no desnaturizante con gradiente 4-12% en la electroforesis vertical XCell SureLock y se ejecutó a 200 V durante 1 hora 50 minutos. Típicamente, la proporción de oligómero se evaluó mediante separación por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de superose 6 seguido por una dosificación posterior de albúmina en cada fracción con el método Bradford, evaluación del tamaño en cada fracción por dispersión dinámica de luz (DLS) y evaluación del peso molecular en cada fracción por electroforesis en gel en un gel de poliacrilamida no desnaturizante con gradiente 4-12%.

Los resultados presentados en la Figura 3 muestran que:

45 - la suspensión de MSA (línea a de la Figura 3) como tal contiene una fracción baja de oligómeros ( $n \geq 2$ ) de albúmina (suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1). Aproximadamente el 10% de la albúmina recogida se identificó como oligómeros de albúmina con pesos moleculares igual a aproximadamente 120 kDa ( $n = 2$ ) (cabe destacar que el peso molecular del monómero de albúmina es igual a aproximadamente 66 kDa). El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando zetasizer NanoZS (Malvern 5 Instrument) con un láser HeNe a 633 nm en un ángulo de 173°. El

50

tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión fue igual a aproximadamente 9 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,207.

- 5 - la suspensión del Ejemplo 1 (línea b de la Figura 3) contiene una mayor proporción de oligómeros de albúmina (suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2) cuando se compara con la suspensión de MSA. Aproximadamente el 50% de la albúmina recogida se identificó como oligómeros de albúmina con pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 120 kDa (n = 2) y aproximadamente 1300 kDa (n = 20) (cabe destacar que el peso molecular del monómero de albúmina es igual a aproximadamente 66 kDa). El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un zetasizer NanoZS (Malvern Instrument) con un láser HeNe a 633 nm en un ángulo de 173°. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas biocompatibles en suspensión fue igual a aproximadamente 30 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,250.

15 Para los experimentos *in vivo* descritos en los Ejemplos 4 y 5, ambas suspensiones de nanopartículas biocompatibles nº 1 y nº 2 se utilizaron para preparar la composición farmacéutica que comprende la combinación de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina (n ≥ 2) o consistiendo en oligómero de albúmina, y de (ii) un compuesto farmacéutico de interés.

Ejemplo 3: Preparación de la al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina (n ≥ 2) (véase Figura 2m) o consistiendo en un oligómero de albúmina (véase Figuras 2a-l), con un tamaño medio de partícula típicamente superior a 50 nm.

20 Las nanopartículas de albúmina se prepararon mediante la técnica de desolvatación (desolvation process and Surface characterization of protein nanoparticles. C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, K. Langer, international Journal of pharmaceutics, V 194; 2000; pp 91-102).

25 Albúmina de suero bovino (BSA) (100 mg) se disolvió en 2 mL de agua destilada a pH 7. Un agente de desolvatación, acetona (5 mL), se añadió gota a gota en una disolución de BSA, hasta que la disolución se volvió turbia. La disolución de agitó durante la noche. El disolvente se eliminó después por evaporación. Las nanopartículas de albúmina se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando JEOL JEM 100CX II HR (véase Figura 4).

Ejemplo 4: Retraso del crecimiento tumoral de la composición farmacéutica que comprende las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y el compuesto DC101 en los xenoinjertos FaDu (RTV ± SD medios).

30 Este estudio se realizó para investigar la eficacia de la composición farmacéutica que comprende las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y DC101 (anticuerpo monoclonal del receptor VEGF 2 antirratón de rata que sustituye al Bevacizumab (Avastin®) para estudio en ratones) como el compuesto terapéutico de interés, en el modelo de tumor FaDu xenoinjertado en ratones nude (desnudos) NMRI.

35 La línea celular FaDu del carcinoma faríngeo humano se obtuvo en LGC Standard (Molsheim, France). Las células se cultivaron en un medio Eagle's Minimum Essential Medium suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco), con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los ratones nude NMRI, de 6-7 semanas (20-25 g) se pidieron a Janvier Labs (Francia). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos (alimentos y agua esterilizados disponibles ad libitum) y se mantuvieron una semana para aclimatarse antes de comenzar el experimento.

40 El tumor FaDu se obtuvo por inyección subcutánea de 2.10<sup>6</sup> células en 50 µL en el costado inferior derecho del ratón. El volumen creció hasta alcanzar un volumen alrededor de aproximadamente de 100 mm<sup>3</sup>. El diámetro del tumor se midió utilizando un calibrador digital y el volumen del tumor en mm<sup>3</sup> se calculó utilizando la siguiente fórmula:

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

45 Los ratones fueron aleatorizados en jaulas separadas e identificados por un número (tatuaje de empeño). Se trataron siete grupos como se ilustra en la Figura 5 y la Tabla 3.

50 Tabla 3: Programa y condiciones de dosis para los grupos de control (grupo 1: vehículo 0,9% de NaCl; grupo 6: nanopartículas biocompatibles nº 2) y grupos de tratamiento (grupo 2: DC101 solo; grupo 3: inyección de nanopartículas biocompatibles nº 2 4h antes de DC101; grupo 4: inyección de nanopartículas biocompatibles nº 2 4h después de DC101; grupo 5: inyección de nanopartículas biocompatibles nº 2 24h después de DC101; grupo 7: inyección de nanopartículas biocompatibles nº 1 4h después de DC101).

Grupos	Tratamiento	Número de ratones/grupo	Vía de adm. DC101	Volumen de adm. DC101 (dosis/adm)	Programa de tratamiento DC101	Programa de inyección de nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1	Nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 (dosis/adm)
1	0,9% de NaCl	5	IP	Equivalente a tratamiento	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas	-	-
2	DC101 solo	5	IP	800 µg/dosis	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas		
3	DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, 4h antes	5	IP	800 µg/dosis	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas	Inyección IV 4h antes de la adm. de tratamiento en D1-D3-D5 durante 3 semanas	10 mL/Kg
4	DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, 4h después	5	IP	800 µg/dosis	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas	Inyección IV 4h después de la adm. de tratamiento en D1-D3-D5 durante 3 semanas	10 mL/Kg
5	DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, 24h después	5	IP	800 µg/dosis	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas	Inyección IV 24h después de la adm. de tratamiento en D1-D3-D5 durante 3 semanas	10 mL/Kg
6	Nanopartículas biocompatibles nº 2	5				Inyección IV en el mismo momento como en el grupo 4 con adm. en D1-D3-D5 durante 3 semanas	10 mL/Kg
7	DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 1, 4h después	4	IP	800 µg/dosis	1 inyección en los días 1-3 y 5 durante 3 semanas	Inyección IV 4h después de la adm. de tratamiento en D1-D3-D5 durante 3 semanas	10 mL/Kg

- Grupo 1: 0,9% de NaCl estéril (grupo de vehículo de control)

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de NaCl al 0,9% estéril (volumen equivalente a la inyección de DC101) en el día 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas.

- Grupo 2: DC101 a 800 µg/dosis (grupo de tratamiento)

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de DC101 estéril (800 µg/dosis) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas.

5 - Grupo 3: Composición farmacéutica, es decir, la combinación de las nanopartículas biocompatibles nº 2 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) y de DC101 (800 µg/dosis) (grupo de tratamiento).

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de DC101 estéril (800 µg/dosis) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas. Cada vez (día), la inyección intravenosa (IV) de la suspensión estéril de nanopartículas biocompatibles nº 2 se realizó 4 horas antes de la inyección de DC101.

10 - Grupo 4: composición farmacéutica, es decir, la combinación de las nanopartículas biocompatibles nº 2 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) y de DC101 (800 µg/dosis) (grupo de tratamiento)

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de DC101 estéril (800 µg/dosis) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas. Cada vez (día), la inyección intravenosa (IV) de la suspensión estéril de nanopartículas biocompatibles nº 2 se realizó 4 horas después de la inyección de DC101.

15 - Grupo 5: composición farmacéutica, es decir, la combinación de las nanopartículas biocompatibles nº 2 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) y de DC101 (800 µg/dosis) (grupo de tratamiento)

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de DC101 estéril (800 µg/dosis) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas. Cada vez (día), la inyección intravenosa (IV) de la suspensión estéril de nanopartículas biocompatibles nº 2 se realizó 24 horas después de la inyección de DC101.

20 - Grupo 6: nanopartículas biocompatibles nº 2 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) (grupo de control)

Cinco ratones (5) se inyectaron por vía intravenosa (IV) con una suspensión estéril de nanopartículas biocompatibles nº 2 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas.

25 - Grupo 7: composición farmacéutica, es decir, la combinación de las nanopartículas biocompatibles nº 1 (65 g/L: 10 mL/Kg de animal) y de DC101 (800 µg/dosis) (grupo de tratamiento)

Cuatro ratones (4) se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) con una disolución de DC101 estéril (800 µg/dosis) en los días 1, día 3 y día 5 de cada semana durante tres semanas consecutivas. Cada vez (día), la inyección intravenosa (IV) de la suspensión estéril de nanopartículas biocompatibles nº 1 se realizó 4 horas después de la inyección de DC101.

30 El producto DC101 (BioXcell – 4,83 mg/ml a pH 7, en PBS) se diluyó a 4,6 mg/ml en NaCl al 0,9% antes de la inyección de 174 µL para obtener una dosis de 800 µg por inyección.

35 La suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1 y la suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2 (contenido de albúmina igual a 65 g/L en tampón de PBS) del Ejemplo 1 se inyectaron sin dilución adicional a 10 mL/Kg de animal.

DC101 se administró mediante inyección intraperitoneal (IP) con una jeringa de insulina de 100 U (0,3 ml) con una aguja de 29 G (TERUMO, Francia). La suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1 y la suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2 del Ejemplo 1 se inyectaron mediante inyección intravenosa (IV) a través de la vena lateral de la cola con una jeringa de 1 mL con una aguja de 26 G (TERUMO, Francia).

40 Los ratones se siguieron por los signos clínicos, peso corporal y tamaño del tumor.

La Figura 6 muestra el volumen del tumor relativo medio (RTV medio) para todos los grupos que se obtienen (en las condiciones anteriormente descritas) después de inyecciones de:

- vehículo inyectado por vía intraperitoneal (NaCl estéril al 0,9%) en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas (grupo 1);

45 - DC101 (800 µg/dosis) inyectado por vía intraperitoneal en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas (grupo 2);

- DC101 (800 µg/dosis) inyectado por vía intraperitoneal en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 2 inyectadas por vía intravenosa 4 horas antes de la inyección de DC101 (grupo 3);

- DC101 (800 µg/dosis) inyectado por vía intraperitoneal en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 2 inyectadas por vía intravenosa 4 horas después de la inyección de DC101 (grupo 4);
- 5 - DC101 (800 µg/dosis) inyectado por vía intraperitoneal en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 2 inyectadas por vía intravenosa 24 horas después de la inyección de DC101 (grupo 5);
- Nanopartículas biocompatibles nº 2 inyectadas por vía intravenosa en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas (grupo 6); y
- 10 - DC101 (800 µg/dosis) inyectado por vía intraperitoneal en los días 1, 3 y 5 de cada semana durante 3 semanas consecutivas con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 1 inyectadas por vía intravenosa 4 horas después de la inyección de DC101 (grupo 7).

15 Como se muestra en la Figura 6, se observa una marcada inhibición del crecimiento tumoral después de 7 días de tratamiento para los grupos que incluyen DC101 sólo (grupo 2) o en combinación con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 2 (grupos 3, 4, 5) o en combinación con nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 1 (grupo 7), cuando se comparan con el grupo de vehículo (grupo 1) y nanopartículas biocompatibles de suspensión nº 2 (grupo 6). Ésta marcada inhibición del crecimiento tumoral es similar entre los grupos 2, 3, 4, 5 y 7.

20 En general, esos resultados muestran que el retraso del crecimiento tumoral obtenido por el tratamiento con DC101 no se modifica cuando se utiliza la composición farmacéutica de la presente invención (que corresponde a la combinación de las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y del DC101 (800 µg/dosis). Este retraso del crecimiento tumoral se observó cuando las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y el compuesto de interés (el DC101) se administraron secuencialmente.

Ejemplo 5: Evaluación de la toxicidad de la composición farmacéutica que comprende las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 y el anticuerpo de DC101 en el xenoinjerto FaDu.

25 Este estudio se realizó para investigar el impacto de la combinación de las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1 con DC101 (anticuerpo monoclonal del receptor VEGF 2 antiratón de rata que sustituye al Bevacizumab (Avastin®) para estudio en ratones) en la toxicidad del tratamiento con DC101 en modelos de tumor de FaDu xenoinjertados en los ratones nude NMRI del Ejemplo 4.

30 A cada ratón de los diferentes grupos (grupos 1 a 7) del experimento del retraso del crecimiento tumoral (Ejemplo 4) se le realizó una autopsia después de la eutanasia del ratón cuando el volumen del tumor excedió los 1000 mm<sup>3</sup> o presentó algún signo de necrosis. Para cada ratón, se observaron los siguientes órganos durante la necropsia para cualquier signo de toxicidad: hígado, bazo, riñones, piel, cerebro, estómago, intestinos, pulmones y corazón. La Tabla 4 muestra las observaciones realizadas durante la necropsia de ratones para cada grupo del Ejemplo 4.

Tabla 4: Observaciones en la necropsia hecha en los diferentes grupos de ratones del Ejemplo 4.

Grupo	Observaciones
Grupo 1: 0,9% de NaCl (5 ratones)	Todos los órganos fueron normales durante la necropsia para 5/5 ratones
Grupo 2: DC101 sólo (5 ratones)	Comparado con el grupo de control (grupo 1): <ul style="list-style-type: none"> <li>- los riñones eran incoloros (marrón claro) para 5/5 ratones</li> <li>- se presentó una esplenomegalia para 3/5 ratones</li> <li>- el hígado era incoloro (marrón claro) para 2/5 ratones</li> <li>- otros órganos (intestinos, corazón, piel, pulmones, estómago, cerebro) fueron similares al grupo de control</li> </ul>
Grupo 3: DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, inyección 4h antes (5 ratones)	Comparado con el grupo de control (grupo 1): <ul style="list-style-type: none"> <li>- los riñones eran incoloros (marrón claro) para 5/5 ratones</li> <li>- se presentó una esplenomegalia para 2/5 ratones</li> <li>- el hígado era incoloro (marrón claro) para 5/5 ratones</li> <li>- otros órganos (intestinos, corazón, piel, pulmones, estómago, cerebro) fueron</li> </ul>

	similares al grupo de control
Grupo 4: DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, inyección 4h después (5 ratones)	Comparado con el grupo de control (grupo 1): - se presentó una esplenomegalia para 1/5 ratones - el hígado era poco incoloro para 2/5 ratones - otros órganos (riñones, intestinos, corazón, piel, pulmones, estómago, cerebro) fueron similares al grupo de control
Grupo 5: DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 2, inyección 24h después (5 ratones)	Todos los órganos fueron normales durante la necropsia para 5/5 ratones, es decir, similar al grupo de control.
Grupo 6: nanopartículas biocompatibles nº 2 (5 ratones)	Todos los órganos fueron normales durante la necropsia para 5/5 ratones, es decir, similar al grupo de control.
Grupo 7: DC101 + nanopartículas biocompatibles nº 1, inyección 4h después (4 ratones)	Comparado con el grupo de control (grupo 1): - se presentó una esplenomegalia para 1/4 ratones - otros órganos (hígado, riñones, intestinos, corazón, piel, pulmones, estómago, cerebro) fueron similares al grupo de control

El grupo 2 (DC101 sólo) presenta signos visuales de toxicidad en el hígado, el bazo y los riñones. Es de destacar que el muestreo de sangre realizado durante el ensayo de retraso del crecimiento tumoral mostró un aumento de la viscosidad de la sangre para todos los ratones del grupo 2.

- 5 Curiosamente, se ha observado que el bloqueo selectivo de VEGFR2 (receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular) por DC101 induce un aumento de la expresión de eritropoyetina (EPO) en el hígado (Nature Medicine vol. 12, N 7, July 2006, pp 793-800). El aumento de la producción de EPO conduce a un aumento de la producción del número de glóbulos rojos y después a un aumento del hematocrito. El aumento del número de glóbulos rojos así como el aumento de hematocrito se ha correlacionado con la inhibición de VEGFR2 por DC101 (Nature Medicine vol. 12, N 7, July 2006, pp 793-800).

10 El aumento del hematocrito con un aumento de la producción de EPO se correlaciona con una eritrocitosis secundaria (Nature Medicine vol. 12, N 7, July 2006, pp 793-800). Se establece que los casos de eritrocitosis, debido al aumento del número de glóbulos rojos, presentan la mayoría de las veces una esplenomegalia (Clin. Lab. Haem. Vol. 21, pp 309-316, 1999). Otra causa de eritrocitosis secundaria puede ser lesiones renales tales como quistes renales (Clin. Lab. Haem. Vol. 21, pp 309-316, 1999). Se ha demostrado que la inhibición de VEGFR2 por DC101 conduce a la formación de quistes renales en ratones (Kidney Inter. Vol. 69, pp 1741-1748, 2006) además de otros fallos renales como la proteinuria que se produce con anticuerpos anti angiogénicos (Jpn J. Clin. Oncol. Vol. 43, N° 6, pp 587-595, 2013).

15 Basándose en la bibliografía disponible de DC101, las observaciones realizadas durante la necropsia en el grupo 2 (DC101 sólo) pueden estar relacionadas con la toxicidad fuera del objetivo del anticuerpo monoclonal anti-angiogénico DC101. Esta conclusión está apoyada por el grupo de vehículos de control (grupo 1) y el grupo 6 (nanopartículas biocompatibles nº 2) para las cuales no se observaron signos de toxicidad durante la necropsia.

20 Asombrosamente los inventores observaron un marcado descenso de toxicidad (según lo evaluado por observación clínica de los órganos durante la necropsia de animales) en animales de los grupos 4 y 7. Incluso más sorprendente, no se observa toxicidad en todos los animales del grupo 5.

25 Conclusión: la combinación de DC101 con nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1, inyectadas por vía intravenosa 4 horas después de la inyección de DC101, es capaz de preservar la eficacia antitumoral de DC101 con una marcada disminución de la toxicidad del tratamiento con DC101. De gran interés, la combinación de DC101 con las nanopartículas biocompatibles del Ejemplo 1, inyectadas por vía intravenosa 24 horas después de la inyección de DC101, es capaz de preservar la eficacia antitumoral de DC101 y abolir completamente la toxicidad del tratamiento con DC101 (cuando se evalúa a través de la observación visual de los órganos principales de los animales en el momento de la necropsia).

Por lo tanto, la nanopartícula biocompatible de la invención, que comprende al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o que consiste en un oligómero de albúmina, puede reducir eficazmente las toxicidades no deseadas de los tejidos normales de los anticuerpos (tales como DC101), cuando dicho al menos un oligómero se administra después del anticuerpo en un sujeto que necesite dicho compuesto de anticuerpo.

- 5 Ejemplo 6: Preparación de la al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) (véase Figura 2m), con un tamaño medio de partícula típicamente de aproximadamente 50 nm.

10 Albúmina de suero de ratón (0,8 g) se disolvió en 10 mL de tampón fosfato de sodio 100 mM (PBS) pH 7,4. La disolución se mezcló con 2,4 mL de una disolución acuosa reciente de 4arm-poli(etilenglicol)-maleimida 11kDa (5 mM). Después de ajustar el pH a 8,2, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, la suspensión resultante se conservó a pH 9. La concentración final de albúmina se determinó utilizando el ensayo BCA y se encontró igual a aproximadamente 64 g/L.

Ejemplo 7: Caracterización de la al menos una nanopartícula biocompatible que consiste en un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) en la suspensión del Ejemplo 6.

15 La presencia de nanopartículas que consisten en al menos un oligómero de albúmina se analizó por electroforesis. 7,5  $\mu$ L de suspensión de albúmina de suero de ratón (MSA) (albúmina 0,5 g/L), de suspensión del Ejemplo 1 (albúmina 0,5 g/L), y de suspensión del Ejemplo 6, se mezclaron con 2,5  $\mu$ L de una disolución de tampón de carga de muestra (4X) de dodecil sulfato de litio (LDS). Se colocó un gel de poli(acrilamida no desnaturizante con gradiente 4-12% en la electroforesis vertical XCell SureLock y se ejecutó a 200 V durante 1 hora 50 minutos.

20 Típicamente, la proporción de oligómero se evaluó mediante separación por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de superose 6 seguido por una dosificación posterior de albúmina en cada fracción con el método Bradford, evaluación del tamaño en cada fracción por dispersión dinámica de luz (DLS) y evaluación del peso molecular en cada fracción por electroforesis en gel en un gel de poli(acrilamida no desnaturizante con gradiente 4-12%.

25 Los resultados presentados en la Figura 7 muestran que:

La suspensión de MSA (línea a de la Figura 7) como tal contiene una fracción baja de oligómeros ( $n \geq 2$ ) de albúmina (suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 1). Aproximadamente el 10% de la albúmina recogida se identificó como oligómeros de albúmina con pesos moleculares comprendidos igual a aproximadamente 120 kDa ( $n = 2$ ) (cabe destacar que el peso molecular del monómero de albúmina es igual a aproximadamente 66 kDa). El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando zetasizer NanoZS (Malvern 5 Instrument) con un láser HeNe a 633 nm en un ángulo de 173°. El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión fue igual a aproximadamente 9 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,207.

35 La suspensión del Ejemplo 1 (línea b de la Figura 7) contiene una mayor proporción de oligómeros de albúmina (suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 2) cuando se compara con la suspensión de MSA. Aproximadamente el 50% de la albúmina recogida se identificó como oligómeros de albúmina con pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 120 kDa ( $n = 2$ ) y aproximadamente 1300 kDa ( $n = 20$ ) (cabe destacar que el peso molecular del monómero de albúmina es igual a aproximadamente 66 kDa). El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un zetasizer NanoZS (Malvern Instrument) con un láser HeNe a 633 nm en un ángulo de 173°. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas biocompatibles en suspensión fue igual a aproximadamente 30 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,250.

45 La suspensión del Ejemplo 6 (línea c de la Figura 7) contiene una mayor proporción de oligómeros de albúmina (suspensión de nanopartículas biocompatibles nº 3) cuando se compara con la suspensión de MSA y la suspensión de las nanopartículas biocompatibles nº 2. Aproximadamente el 70% de la albúmina recogida se identificó como oligómeros de albúmina con pesos moleculares comprendidos entre aproximadamente 120 kDa ( $n = 2$ ) y aproximadamente 1300 kDa ( $n = 20$ ) (cabe destacar que el peso molecular del monómero de albúmina es igual a aproximadamente 66 kDa). El tamaño medio de partícula de las nanopartículas biocompatibles en suspensión se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un zetasizer NanoZS (Malvern Instrument) con un láser HeNe a 633 nm en un ángulo de 173°. El tamaño medio de partículas de las nanopartículas biocompatibles en suspensión fue igual a aproximadamente 50 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,475.

50



## REIVINDICACIONES

1. Una combinación farmacéutica de (i) al menos una nanopartícula biocompatible, comprendiendo dicha nanopartícula biocompatible al menos un oligómero de albúmina ( $n \geq 2$ ) o consistiendo en un oligómero de albúmina, y de (ii) al menos un compuesto farmacéutico que comprende o consiste en al menos un anticuerpo, en donde la dimensión más larga o más grande de la al menos una nanopartícula biocompatible está entre aproximadamente 4 nm y aproximadamente 500 nm, para su uso en un método terapéutico, profiláctico o de diagnóstico en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método terapéutico, profiláctico o de diagnóstico una etapa para administrar el compuesto farmacéutico al sujeto y una etapa distinta para administrar la al menos una nanopartícula, administrándose dicha al menos una nanopartícula al sujeto entre más de 5 minutos y aproximadamente 72 horas después del compuesto farmacéutico, y en donde la nanopartícula biocompatible no se utiliza como tal como un compuesto farmacéutico.
2. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el al menos un oligómero de albúmina es un dímero de albúmina ( $n = 2$ ), un trímero de albúmina ( $n = 3$ ), o comprende al menos 4 monómeros de albúmina ( $n \geq 4$ ).
3. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el al menos un oligómero de albúmina comprende menos de 50 monómeros de albúmina, preferiblemente menos de 25 monómeros de albúmina.
4. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los monómeros de albúmina se conjugan unos con otros para formar un oligómero de albúmina mediante interacción directa o mediante un enlazador.
5. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en donde el enlazador es un reticulante que comprende al menos un grupo maleimida.
6. La combinación farmacéutica para su uso según la reivindicación 4 o 5, en donde la combinación comprende nanopartículas biocompatibles distintas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la al menos una nanopartícula biocompatible se administra a un sujeto que lo necesita después del compuesto farmacéutico.
8. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto farmacéutico comprende o consiste en al menos un anticuerpo, siendo seleccionado dicho al menos un anticuerpo de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo conjugado con un fármaco, un anticuerpo manipulado y un anticuerpo multiespecífico.
9. La combinación farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la administración combinada de la al menos una nanopartícula biocompatible y del compuesto farmacéutico mantiene, o incluso aumenta, el beneficio terapéutico del compuesto farmacéutico para una toxicidad reducida, cuando se compara con el beneficio terapéutico y la toxicidad inducida por la dosis terapéutica estándar de dicho compuesto farmacéutico en ausencia de la nanopartícula biocompatible.

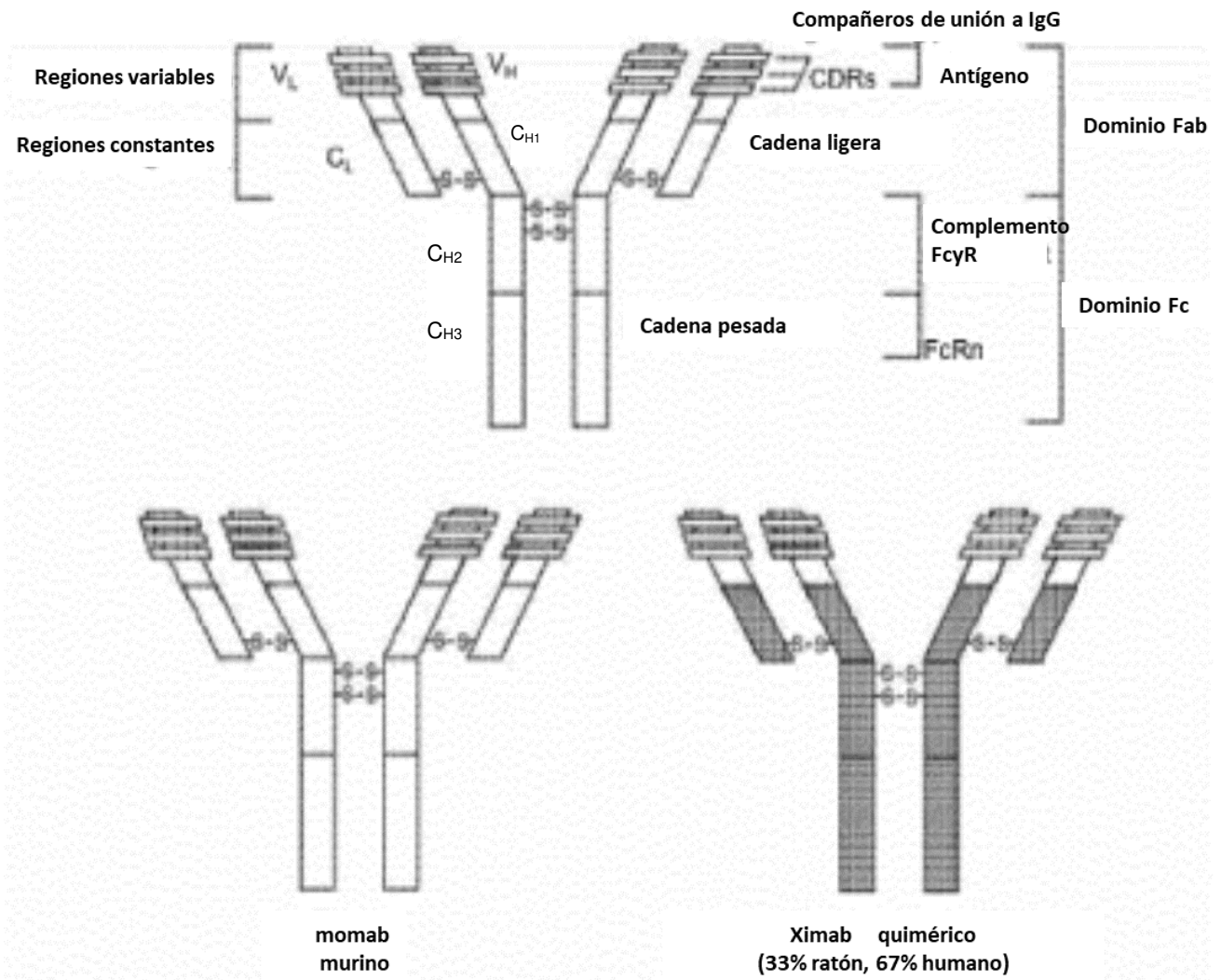


FIGURA 1

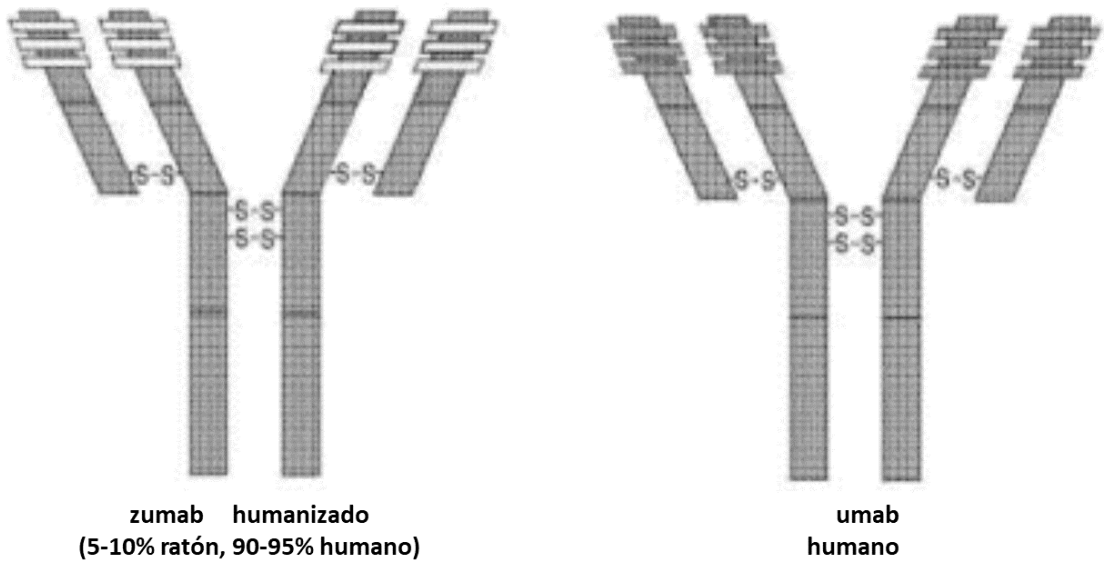


FIGURA 1 (continuación)

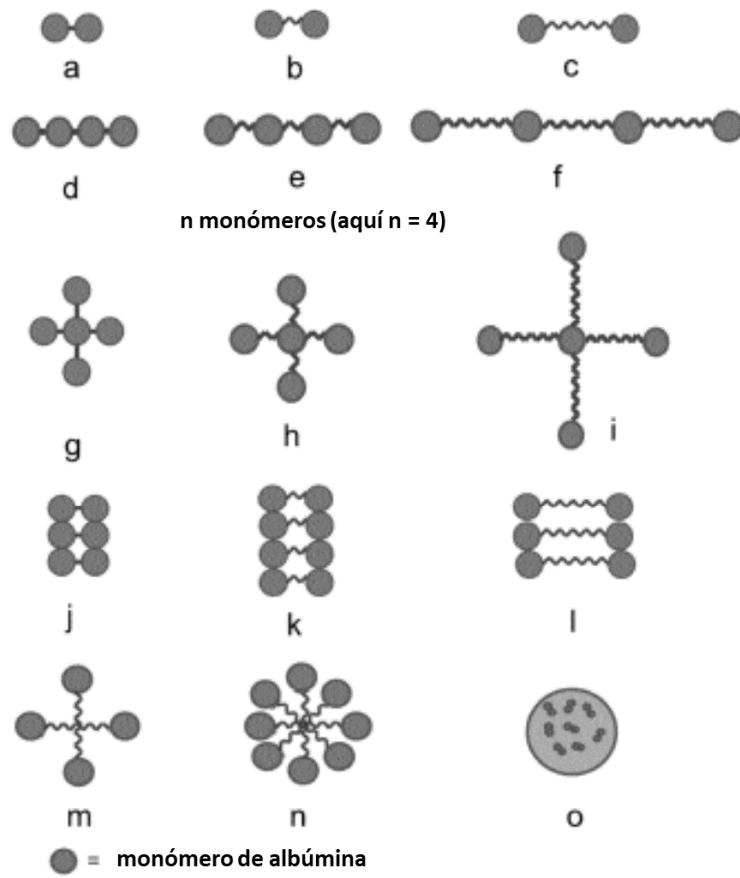


FIGURA 2

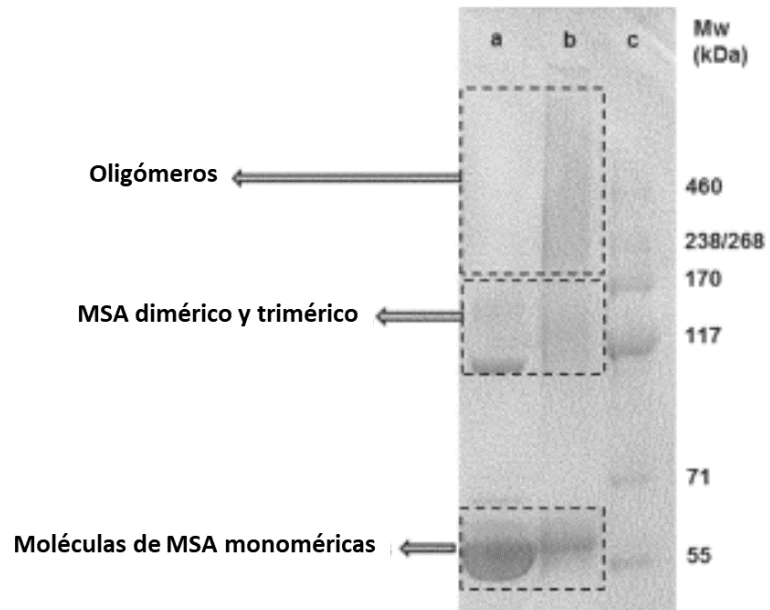
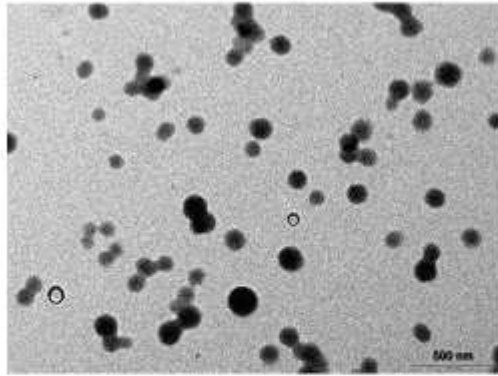


FIGURA 3



**FIGURA 4**

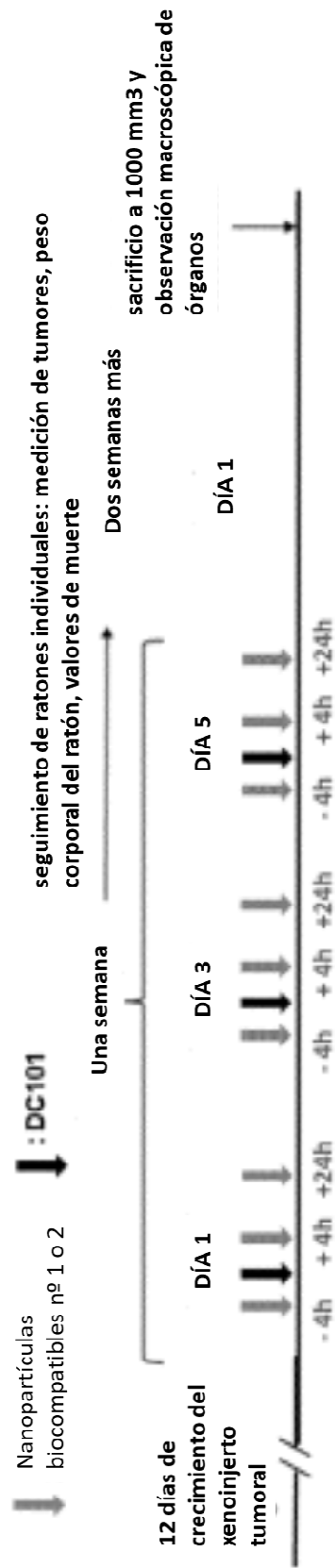


FIGURA 5

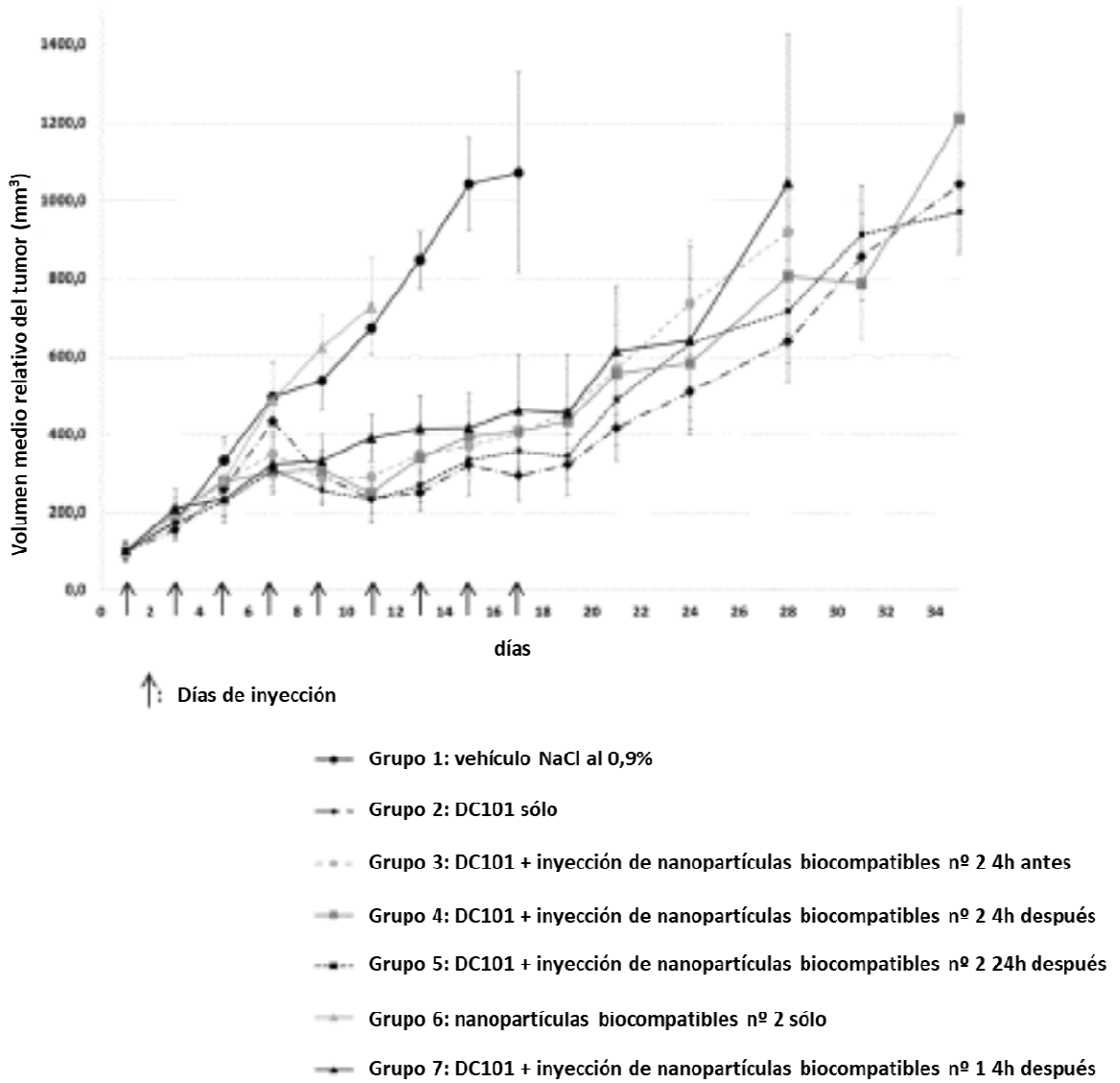


FIGURA 6



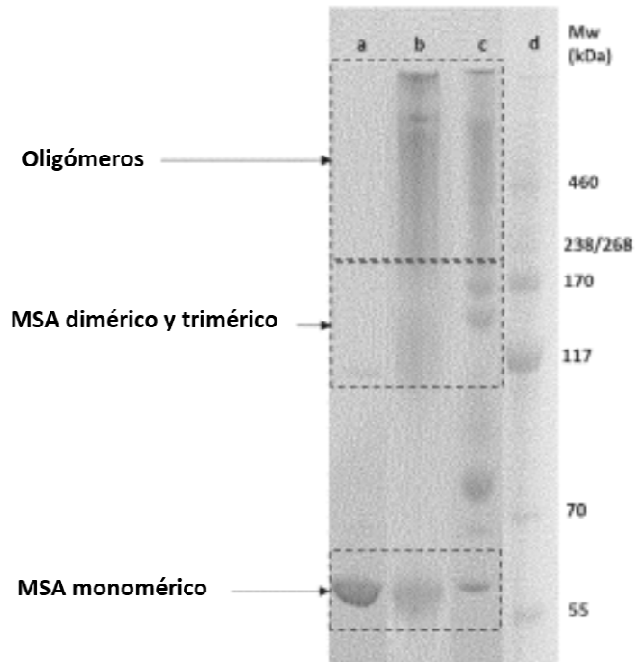


FIGURA 7