

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 211**

51 Int. Cl.:

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 50/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2013 PCT/US2013/036487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13155487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2013 E 13718738 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2836234**

54 Título: **Vehículos para la administración controlada de diferentes agentes farmacéuticos**

30 Prioridad:

12.04.2012 US 201261623486 P

31.12.2012 US 201261747624 P

31.12.2012 US 201261747614 P

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

28.02.2020

73 Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)

Two Whitney Avenue

New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

FAHMY, TAREK, M.;

STERN, ERIC;

FLAVELL, RICHARD, A.;

PARK, JASON;

SIEFERT, ALYSSA y

WRZESINSKI, STEPHEN H.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 745 211 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

Vehículos para la administración controlada de diferentes agentes farmacéuticos

5 **Declaración sobre la investigación o desarrollo de patrocinio federal**

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno según los acuerdos R01-HL085416 y R01-EB008260 otorgados a Tarek M. Fahmy por los Institutos Nacionales de Salud, el número de Subvención de salud pública HL-55397 otorgado a Tarek M. Fahmy y el número de subvención NIRT CTS3090609326 otorgado a Tarek M. Fahmy por la Fundación Nacional para la Ciencia. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo de la invención

15 La presente invención se incluye generalmente en el campo de la administración sostenida de moléculas de alto y bajo peso molecular o hidrófilas e hidrófobas, especialmente antígeno o tumor y moléculas inmunomoduladoras, usando nanopartículas de núcleo-cubierta, que pueden ser dirigidas por tamaño y composición a una célula deseada o tipo de tejido para mejorar la eficacia.

Antecedentes de la invención

20 Aunque la eficacia de los tratamientos terapéuticos depende críticamente del mecanismo de acción del agente o agentes utilizados, a menudo otros factores son instrumentales para obtener una respuesta óptima. La dosis tolerable y el tiempo de administración en relación con el inicio de la enfermedad son otras consideraciones clave. Además, hay una serie de problemas complejos relacionados con las características farmacocinéticas y farmacodinámicas que también pueden ser importantes en la respuesta terapéutica. A lo largo de los años, se han realizado muchos estudios con una amplia gama de agentes terapéuticos en un esfuerzo por establecer estrategias óptimas para la administración de fármacos. Con el tiempo, más y más regímenes farmacológicos para prácticamente todos los tipos de enfermedades se han diseñado para incluir terapias combinadas; en algunos casos, las combinaciones se usan para mejorar la eficacia combinando fármacos que tienen los mismos o diferentes objetivos de enfermedad; en otros, los fármacos con diferentes mecanismos de acción pueden actuar sinérgicamente; y en otros, las terapias combinadas pueden incluir uno o más fármacos que actúan directamente sobre el estado de la enfermedad junto con uno o más agentes que tienen un efecto beneficioso, como la reducción del dolor y/o la protección contra los efectos secundarios de los órganos que no están directamente involucrados la enfermedad y/o la promoción de actividades deseables por mecanismos defensivos naturales, especialmente el sistema inmunitario. Dichos fármacos dispares con papeles dispares en el tratamiento de enfermedades a menudo difieren drásticamente con respecto a la naturaleza química y, por lo tanto, los problemas de administración de fármacos en la terapia combinada pueden ser muy difíciles de abordar.

40 Las estrategias que implican el uso de vehículos miniaturizados que pueden encapsular fármacos de tal manera que permitan la liberación controlada han demostrado ser prometedoras como una forma de optimizar las características de administración de fármacos. Dichos sistemas ofrecen la posibilidad de un tratamiento y control exitosos de muchas enfermedades con fármacos cuyas semividas sistémicas y biodistribución son críticas. Debido a la naturaleza química diversa de los diferentes fármacos, existe una clara ventaja en el diseño y la disponibilidad de un vehículo miniaturizado que pueda controlar la liberación del fármaco de una manera que sea independiente de la naturaleza química del fármaco.

50 Las vacunas de partículas son tecnologías prometedoras para la creación de agentes profilácticos y terapéuticos ajustables contra una amplia variedad de afecciones. Las plataformas poliméricas biodegradables sólidas y vesiculares, ejemplificadas por liposomas y poliésteres, respectivamente, son dos de las plataformas más ubicuas en los estudios de administración de vacunas. La inmunización con nanopartículas de poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) provoca títulos de anticuerpos prolongados en comparación con los liposomas y el alumbre. La magnitud de la respuesta inmunitaria celular es más alta en animales vacunados con PLGA, que también muestra una mayor frecuencia de fenotipo de linfocitos T de memoria de tipo efector, lo que conduce a una eliminación efectiva de bacterias intracelulares. Se muestra que la diferencia en el rendimiento de estas dos plataformas de partículas comunes no se debe a diferencias materiales, sino que parece estar relacionada con la cinética de la administración del antígeno. Los liposomas se modifican fácilmente para encapsular pequeñas moléculas hidrófilas e incluso proteínas. Sin embargo, la estabilidad de estas formulaciones y los perfiles de liberación de los agentes encapsulados no se controlan fácilmente. Las partículas sólidas biodegradables, por otro lado, como las fabricadas con poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), son altamente estables y tienen características de liberación controlables, pero plantean complicaciones para la encapsulación fácil y la liberación controlada de citocinas terapéuticas o para administración combinatoria. Para superar estas limitaciones, las plataformas híbridas que integran características de diferentes materiales pueden ofrecer ventajas en la encapsulación y administración combinada. Dichos sistemas se han demostrado basándose en una metodología núcleo-cubierta en la que las moléculas de interés mesoporosas o nanoporosas orgánicas o inorgánicas que recubren las moléculas de interés están recubiertas con lípidos o polímeros. Estos sistemas híbridos pueden mejorar la encapsulación y liberar una amplia variedad de agentes, como fármacos de molécula pequeña, proteínas y ácidos nucleicos, al tiempo que promueven una farmacocinética

favorable y una biodistribución del encapsulante.

Los sistemas hibridados, como tales, son alternativas de administración de fármacos claramente atractivas y han sido explorados en diferentes estudios. Dichos sistemas se pueden diseñar con una bicapa de fluidos biológicos que mejora su circulación o potencial de direccionamiento mientras que permite la administración de agentes de diferentes propiedades físicas. Se han demostrado varios sistemas híbridos de núcleo y cubierta para este propósito y, de hecho, ofrecen nuevas y emocionantes posibilidades de administración combinada que pueden funcionar en la terapia contra el cáncer.

Está claro que la tasa de liberación de bioactivos, especialmente en el campo de las vacunas, es de importancia crítica para la función, no solo del tipo de bioactivos que se incorporan. La complejidad asociada con la administración de dos agentes diferentes, como un antígeno y un inmunomodulador, hace que sea más difícil encontrar un vehículo de administración que permita la liberación controlada de los agentes a diferentes velocidades. Este es particularmente el caso donde las propiedades de los dos agentes son diferentes, como cuando uno es hidrófobo y uno es hidrófilo, o uno es de alto peso molecular y el otro es de bajo peso molecular. Aunque es posible proporcionar partículas que difieran en propiedades químicas, es difícil asegurar que los agentes se liberen en el momento correcto, por ejemplo, sin tener que difundirse desde el núcleo a través de la cubierta, donde el núcleo es hidrófobo y la cubierta es hidrófila (o viceversa) y las propiedades de los agentes los llevan a migrar a otra área del dispositivo de administración en lugar de salir del dispositivo o, por ejemplo, donde un agente tiene un peso molecular muy bajo y tiende a difundirse rápidamente y el otro agente tiene un peso molecular muy alto y tiende a difundirse extremadamente lentamente.

El documento WO 2007/005754 se refiere a composiciones de liposomas que tienen una alta concentración de fármaco de un fármaco hidrófobo, y que son capaces de retener el fármaco en forma atrapada.

El documento EP 2 494 960 se refiere a liposomas que comprenden una bicapa y una fase de agua interna, en el que la fase de agua interna contiene ciclodextrina de sulfobutiléter y un compuesto activo.

El documento WO 95/15746 se refiere a liposomas que contienen en la fase acuosa dentro del liposoma al menos un complejo, en el que el complejo comprende al menos una molécula unida de forma no covalente a al menos un receptor.

El documento EP 2 177 230 se refiere a un inmunoliposoma que comprende, como constituyente, un anticuerpo capaz de inducir la apoptosis de células que expresan un receptor que contiene un dominio de muerte.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar medios para la administración de dos o más agentes farmacéuticos a velocidades diferentes, especialmente agentes con diferentes propiedades químicas y/o pesos moleculares.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se han desarrollado nanolipogeles, métodos de incorporación de agentes en estos vehículos de administración y fabricación y uso de estas composiciones para el tratamiento de enfermedades. Estos están diseñados para cargarse con agentes antes, durante o después de la formación y posteriormente funcionan como vehículos de liberación controlada para los agentes. El "nanolipogel" es una nanopartícula que combina las ventajas de los liposomas y las partículas a base de polímeros para la administración sostenida de proteínas y moléculas pequeñas. En una realización preferida, el nanolipogel es un dendrímero envuelto en lípidos (LED).

El nanolipogel se carga normalmente con más de un agente, de modo que posteriormente se logra la liberación controlada de la multiplicidad de agentes.

El nanolipogel se carga con uno o más primeros agentes durante la formación y uno o más segundos agentes después de la formación por el proceso de rehidratación del nanolipogel en presencia de los segundos agentes. Por ejemplo, el nanolipogel se carga con una molécula que sirve como adyuvante y el nanolipogel incorpora posteriormente uno o más antígenos diana después de la formación, para la liberación controlada de adyuvante junto con los antígenos. Como alternativa, el nanolipogel cargado con adyuvante se inserta en el sitio de un tumor en un paciente, el tumor se extirpa, el nanolipogel se carga con antígenos tumorales liberados y el nanolipogel libera los antígenos tumorales junto con el adyuvante en el cuerpo del paciente en una manera controlada.

Un nanolipogel está construido con cualquiera de varios materiales de hidrogel adecuados, o combinaciones de los mismos, u otros materiales que son capaces *in situ* de cargar y liberar agentes como la ciclodextrina o las resinas de intercambio iónico. El nanolipogel puede estar en forma de esferas, discos, varillas u otras geometrías con diferentes relaciones de aspecto. El nanolipogel se forma normalmente con polímeros sintéticos o naturales capaces de encapsular agentes mediante carga remota y en el cual se pueden ajustar las propiedades para facilitar diferentes

velocidades de liberación.

Un nanolipogel es un vehículo de administración que incluye una bicapa lipídica que rodea un núcleo de hidrogel, que puede incluir un absorbente tal como una ciclodextrina o resina de intercambio iónico. Los nanolipogeles pueden construirse para incorporar varias entidades químicas diferentes que posteriormente pueden liberarse de manera controlada. Estas diferentes entidades químicas incorporadas pueden diferir drásticamente con respecto al tamaño y la composición. Los nanolipogeles se han construido para contener proteínas coencapsuladas, así como pequeños fármacos hidrófobos dentro del interior de la bicapa lipídica. Los agentes incorporados dentro de los nanolipogeles pueden liberarse en el medio de forma controlada, por ejemplo, los nanolipogeles proporcionan un medio para lograr la liberación sostenida simultánea de agentes que difieren ampliamente en la composición química y el peso molecular. Además, los nanolipogeles pueden modular favorablemente la biodistribución.

En un ejemplo no limitante, uno de los agentes es un antígeno y un segundo agente es un inmunoadyuvante, lo que resulta en una liberación sostenida del antígeno junto con el adyuvante para optimizar una respuesta inmunitaria. En un ejemplo, se logra la administración sostenida simultánea por nanolipogeles de una proteína inmunoestimuladora, interleucina-2 (IL-2), así como una molécula orgánica de bajo peso molecular, clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-*terc*-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina, un inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Esta construcción conduce a una respuesta antitumoral en un sistema murino que es muy superior a la que se puede lograr con la administración en solución de un agente solo o una combinación de ambos.

Los ejemplos demuestran la importancia de la persistencia de antígeno mediada por plataformas de partículas y su papel en la aparición a largo plazo de la respuesta celular de la memoria efectora. La administración sistémica de nanopartículas ("NP") cargadas de citocinas dirigidas a CD4 fue capaz de promover la tolerancia a través de la expansión de células reguladoras del hospedador en modelos de aloinjerto murino. Las NP de TGF- β /IL-2 dirigidas a CD4 solo indujeron un aumento del 3 % en la frecuencia de Treg en el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones sanos. La transfusión específica de donantes de esplenocitos pretratados con NP de nanopartículas LIE dirigidas a CD4 dio como resultado un aumento de 4 veces en los Tregs específicos de donantes y una tolerancia significativamente mejorada de aloinjertos cardíacos completamente incompatibles de 7 a 12 días.

En el modelo de melanoma murino B16, se hipotetiza que los efectos proliferativos y antitumorales de la terapia con citocinas IL-2 se ven frustrados por la secreción de TGF- β y la actividad de Tregs dentro del tumor. Por lo tanto, se usaron nanolipogeles para co-administrar el inhibidor de TGF- β SB505124 de molécula pequeña e IL-2 al microambiente tumoral. Se descubrió que la administración localizada de fármacos en tumores es crítica. Los beneficios de supervivencia o las reducciones más sorprendentes y significativas en el crecimiento tumoral se observaron en ratones que recibieron la administración simultánea de SB e IL-2 mediado por nanolipogel ("nLG"). Las monoterapias y la terapia con agentes solubles no lograron retrasar el crecimiento tumoral subcutáneo incluso cuando se administraban mediante inyección intratumoral, pero nLG-SB+IL-2 indujo retrasos significativos en las tasas de crecimiento tumoral e incluso tuvo como resultado una regresión completa en el 40 % de los ratones seguidos para la supervivencia a largo plazo. La encapsulación en nanolipogeles mejoró la circulación del fármaco después de la dosificación intravenosa y dio como resultado un aumento de la dosis de casi 4 veces en los pulmones hasta 72 horas después de la administración. Después de una semana de terapia, la terapia con nanolipogel intravenoso (nLG-SB+IL-2) redujo significativamente el número de crecimientos pulmonares metastásicos en comparación con los controles.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B son esquemas de la fabricación de las partículas de nanolipogel (nLG). En la Figura 1A, se usó ciclodextrina (CD) funcionalizada con metacrilato para solubilizar un bioactivo tal como el inhibidor de TGF- β (SB505124). En la Figura 1B, los nanolipogeles se formularon a partir de liposomas liofilizados cargados con polímero de reticulación biodegradable, complejo de fármaco acrilado (CD-SB505) y un segundo fármaco como el péptido citosina IL-2. Esta estructura núcleo-cubierta facilitó el atrapamiento de la CD cargada con el fármaco y la IL-2 en una matriz polimérica biodegradable interior con un exterior liposómico PEGilado. La β -ciclodextrina succinilada (CTD, Inc.) se funcionalizó con metacrilato de 2-aminoetilo (Sigma) agitando una relación molar 1:3 de los compuestos en 1X PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determinaron los espectros de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) de SB505124, β -CD aleatoriamente succinilada, y el complejo de inclusión de SB505124 con β -CD succinilada aleatoriamente. Las diferencias observadas en la región de protones aromáticos de SB505124 demuestran la formación del complejo de inclusión. Los espectros de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) de la rodamina B, la β -CD succinilada aleatoriamente, y el complejo de inclusión de rodamina B con β -CD succinilada aleatoriamente mostró que las diferencias observadas en la región de protones aromáticos de rodamina B demuestran la formación del complejo de inclusión.

Las Figuras 1C-1G muestran la caracterización del nanolipogel. El tamaño del nanolipogel se determinó mediante dispersión dinámica de luz en un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments) en PBS a temperatura ambiente. La Figura 1C muestra que la encapsulación de SB o SB+IL-2 no tuvo un efecto significativo sobre el diámetro medio de las partículas o la polidispersidad. El diámetro medio y el índice de polidispersidad son representativos de 2 lotes de cada tipo de nanolipogel ($n = 10$ mediciones por muestra). El potencial zeta de los liposomas de PC/colesterol, PC/colesterol/PE-PEG-NH₂ y los nanolipogeles se evaluaron

en PBS 0,1x usando un nanoescalador Malvern. La Figura 1D muestra que se descubrió que el potencial zeta de los liposomas y nanolipogees que incorporan PE-PEG terminado en amina era cercano al neutro. La Figura 1E muestra la composición y las propiedades de formulación de la formulación de nanolipogel. La Figura 1F muestra la estructura del polímero verificado por RMN de ^1H . La crio-TEM de los nanolipogees demuestra la formación de estructuras liposomales esféricas. Para el análisis TEM, las muestras de nanolipogel se tiñeron con tetróxido de osmio y luego se tomaron imágenes en un microscopio FEI Tenai Biotwin. La tinción de tetróxido de osmio específica de lípidos de muestras crioseccionadas tenía un patrón de tinción localizado limitado a la membrana exterior de la partícula. La Figura 1G muestra que el polímero/CD fotopolimerizado forma estructuras de hidrogel nanoparticuladas que son detectables por dispersión de luz incluso después de la alteración del exterior liposomal por detergente.

Las Figuras 2A-2E son perfiles de liberación comparativos de nLG, liposomas y nanopartículas de polímero sólido (PLGA). La CD acumulada o la SB solubilizada con CD funcionalizada con metacrilato (f-CD) liberada de nLG normalizados por la masa de vehículo inicial demostró que la polimerización de nanolipogees mejoró la naturaleza sostenida de la liberación de SB (Figura 2A). Se usó hidroxipropil β -CD para la formación del complejo de SB con la CD no funcionalizada. La IL-2 acumulada liberada determinada por ELISA (inmunoactiva) y por un estudio de bioactividad (bioactivo) a partir de nLG normalizados por la masa inicial de nanolipogel demostró que la bioactividad de IL-2 no se vio afectada por la encapsulación (Figura 2B). La liberación de SB e IL-2 no se vio afectada por la incubación de 10 mg de nLG en 1 ml de suero completo (Figura 2C). La liberación acumulativa comparativa de SB de liposomas, nanolipogees y nanopartículas poliméricas degradables (poliláctido-co-glicólido) (NP de PLGA) demostró que la incorporación de polímero fotocurado en el vehículo de nanolipogel permitió una mejor liberación sostenida y una liberación más completa de SB solubilizado en ciclodextrina (Figura 2D). Los NP de PLGA (diámetro medio = 150 ± 50 nm) se prepararon usando una técnica de doble emulsión de agua/aceite/agua modificada. Los liposomas se prepararon de manera idéntica a los nLG sin el núcleo del polímero. Los liposomas se cargaron con IL-2 y SB similares a los nanolipogees. El porcentaje disminuido de SB encapsulado liberado de kis NP de PLGA se atribuye a la interacción del polímero relativamente hidrófobo con SB. Todas las formulaciones en partículas se disolvieron en NaOH 0,1N + SDS al 1 % para determinar el 100 % de liberación a los 7 días (flecha) (Figura 2D). La liberación acumulativa comparativa de IL-2 de liposomas, nanolipogees y NP de PLGA demostró que la encapsulación de IL-2 en nanolipogees permitía una mejor liberación sostenida de citocina. La liberación acumulativa se presenta como % del total de IL-2 liberada durante 7 días (Figura 2E) Los datos en todos los gráficos representan la media de muestras triplicadas ± 1 desviación estándar. La Figura 2F compara los tamaños y la carga de IL-2 y SB en PLGA, nanolipogees y liposomas.

Las Figuras 3A-3G son gráficos que muestran la liberación controlada, el aclaramiento y la biodistribución. La distribución tanto del vehículo de nanolipogel como de la carga útil del fármaco encapsulado se investigó usando NLG de doble marca; se incorporó fosfoetanolamina marcada con fluoresceína en el componente lipídico de nanolipogees cargados de rodamina. El análisis espectrofluorimétrico a 540/625 nm y 490/517 nm muestra fluorescencia dependiente de la dosis sin solapamiento espectral. La Figura 3A es un gráfico de IL-2 acumulativa (ng/mg de nLG) y fármaco (μg de SB/mg de nLG) liberados de nLGs co-cargados normalizado por la masa del vehículo. Las barras de error en todos los gráficos representan ± 1 desviación estándar. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces con resultados similares. La Figura 3B es un gráfico que muestra el aclaramiento (porcentaje de la dosis inicial) de la dosis del fármaco a lo largo del tiempo en días: la encapsulación en nanolipogees aumentó significativamente el porcentaje restante de la dosis inicial en la sangre a las 1 y 24 horas después de la inyección (prueba t de dos poblaciones, $P < 0,01$ ###). La Figura 3C es un gráfico de distribución de todo el cuerpo. Los ratones recibieron una dosis única de nanolipogel cargado de rodamina o rodamina soluble (en solución salina) por inyección intravenosa en la vena de la cola. Los animales fueron sacrificados a las 1, 24, 48 y 72 horas después de la inyección para extracción y cuantificación de fluorescencia; la biodistribución de todo el cuerpo se determinó con marcado de rodamina. Se detectaron cantidades significativamente mayores (prueba t de dos poblaciones, $P < 0,01$) de rodamina en los órganos principales de los animales tratados con nanolipogel en comparación con los animales inyectados con colorante libre. La Figura 3D es un gráfico de la acumulación dependiente del tiempo n en el tumor subcutáneo: penetración acumulativa del tumor de rodamina (círculos) después de la inyección peritumoral de B16 en ratones B6. Se recogió tejido peritumoral para cuantificar la dosis restante de nLG que rodea el tumor (cuadrados). La liberación controlada demuestra la liberación de rodamina, pero no de lípidos (Figura 3E). Los ratones con tumores B16 subcutáneos recibieron una única inyección IV (vena de la cola) de NLG doblemente marcado. Los animales se sacrificaron a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inyección y los tejidos se recolectaron para homogeneización, extracción y cuantificación de rodamina y fluoresceína-PE. El análisis del suero muestra una circulación prolongada tanto del encapsulante como del vehículo de administración. Se observaron patrones similares de biodistribución entre los lípidos (Figura 3F) y la carga útil de los fármacos (Figura 3G), con mayores acumulaciones de fármacos en los pulmones y el hígado.

Las Figuras 4A-4C son gráficos que muestran los efectos clínicos de la terapia de nanolipogel intratumoral en el melanoma subcutáneo. La Figura 4A es un gráfico del área tumoral frente al tiempo (el día 0 fue el día de la inyección de células tumorales). Las flechas rojas indican tratamientos (mediante inyección intratumoral). Los ratones con tumores subcutáneos se sacrificaron cuando la mayor dimensión del tumor era mayor de 15 mm o cuando presentaban signos de enfermedad. Las áreas tumorales de ratones fallecidos no se incluyeron después del día de la muerte. Cada grupo inicialmente contenía cinco ratones, excepto el grupo nLG-SB+IL-2, que contenía cuatro. Las barras de error representan ± 1 desviación estándar. Los tumores en los grupos nLG-SB y nLG-SB+IL-2 son significativamente más pequeños que los de los otros grupos (prueba T de dos poblaciones, P

< 0,001) a partir del día 12. Los tumores en el grupo nLG-SB+IL-2 son significativamente más pequeños que en el grupo nLG-SB a partir del día 17 ($P < 0,01$, ##) y todos los demás días posteriores ($P < 0,001$). La Figura 4B es un gráfico de masas tumorales de grupos tratados con nLG siete días después del tratamiento. Los ratones fueron sacrificados directamente antes de la determinación de la masa tumoral. Las barras de error representan ± 1 desviación estándar promediada en seis ratones (nLG-Vacío), diez (nLG-IL-2), nueve (nLG-SB) y diez (nLG-SB+IL-2). Cada grupo inicialmente contenía 10 ratones. Las pruebas T de dos poblaciones mostraron que los tumores en el grupo nLG-SB+IL-2 eran significativamente más bajos que en los grupos nLG-Vacío ($P < 0,001$, ***), nLG-IL-2 ($P < 0,001$, ***) y nLG-SB ($P < 0,05$, *). Una prueba T de dos poblaciones mostró que las masas tumorales en el grupo nLG-IL-2 fueron significativamente más bajas que en el nLG-Vacío ($P < 0,05$, #). La Figura 4C es una gráfica de supervivencia de ratones del mismo estudio dado en la Figura 4A. Las flechas indican los días de tratamiento. La supervivencia de los ratones tratados con nLG-SB fue significativamente mayor por los análisis Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon ($P < 0,01$) y nLG-SB+IL-2 prolongó significativamente la supervivencia por ambos análisis ($P < 0,001$). Los estudios se repitieron 2-3 veces con resultados similares.

Las Figuras 5A-5C muestran la respuesta inmunitaria adaptativa y el mecanismo de acción de nLG-SB+IL-2. Cada grupo contenía seis ratones y los estudios se repitieron 2-3 veces con resultados similares. La Figura 5A es un gráfico del número absoluto de linfocitos CD8⁺ activados en tumores pulmonares (normalizado por número de tumores). Todos los grupos tienen números significativamente mayores ($P < 0,01$) en comparación con nLG vacíos. La Figura 5B es un gráfico del número absoluto de linfocitos CD8⁺ activados presentes en tumores (normalizado por masa tumoral) extraídas de ratones siete días después del tratamiento. El tratamiento con nLG-SB aumentó significativamente las poblaciones de CD8⁺ activados ($P < 0,05$), al igual que el tratamiento con nLG-IL-2 o nLG-SB+IL-2 ($P < 0,001$), respecto a las partículas no cargadas. Las barras de error representan ± 1 desviación estándar promediada en seis ratones (nLG-Vacío), diez (nLG-IL-2), nueve (nLG-SB) y diez (nLG-SB+IL-2). Cada grupo inicialmente contenía 10 ratones. La figura 5C es un gráfico de la relación CD8⁺ activados:Treg en TIL. Todos los grupos tienen relaciones significativamente mayores ($P < 0,05$) en comparación con nLG vacíos.

Las Figuras 6A-6C son gráficos que muestran el papel de los linfocitos NK en la inmunoterapia tumoral después de la administración combinada. Cada grupo contenía seis ratones y los estudios se repitieron 2-3 veces con resultados similares. La Figura 6A es un gráfico del número absoluto de linfocitos NK presentes en los tumores (normalizado por número de tumores). En comparación con el grupo de partículas vacías, hubo significativamente más NK en los pulmones después del tratamiento con nLG-SB+IL-2 ($P < 0,05$), nLG-SB ($P < 0,05$) y nLG-IL-2 ($P < 0,01$). La Figura 6B es un gráfico que compara las masas tumorales de ratones de tipo silvestre (WT) o con NK agotados (NKD) sacrificados siete días después del tratamiento inicial. Cada grupo inicialmente contenía 10 ratones. El grupo WT tratado con nLG-SB+IL-2 tiene tumores significativamente más pequeños que todos los demás grupos de tratamiento ($P < 0,001$). Los grupos NKD nLG-SB y nLG-SB+IL-2 tienen tumores significativamente más grandes que sus contrapartes WT (ambos $P < 0,001$). Los estudios se repitieron 2-3 veces con resultados similares. La Figura 6C es un gráfico del número absoluto de linfocitos NK presentes en tumores (normalizado por masa tumoral) para el mismo estudio. El grupo tratado con nLG-SB+IL-2 tiene significativamente más NK que el grupo control ($P < 0,01$), el grupo tratado con SB ($P < 0,05$) y el grupo tratado con IL-2 ($P < 0,01$). Las barras de error representan ± 1 desviación estándar promediada en seis ratones (nLG-Vacío), diez (nLG-IL-2), nueve (nLG-SB) y diez (nLG-SB+IL-2).

La Figura 7A es un esquema de preparación de LED que encapsula el políplex de ARNip/dendrímico y las combinaciones de fármacos, con modificación covalente de la cubierta externa con anticuerpos o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) dirigidos. La Figura 7B es un gráfico de la citotoxicidad de LED y LED que encapsula el fármaco modelo metotrexato (MTX). Las barras indican diluciones sucesivas de LED o fármaco o combinaciones de 1 mg/ml a 10 μ g/ml. La azida se usa como control positivo para la muerte celular. La Figura 7C es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células que exhiben disrupción endosómica después del tratamiento con dendrímeros PAMAM de cuarta generación (G4) no modificados, o dendrímeros conjugados con moléculas de ciclodextrina (CD) que sustitúan y protegen aminas primarias con o sin FCCP, un ionóforo de molécula pequeña, carbonilcianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona. La Figura 7D es un gráfico de barras que muestra el número de células positivas para GFP como un porcentaje del total de células transfectadas con pGFP usando varios LED (G4, G4-3CD, G4-6CD) en varias relaciones N/P. La Figura 7E es un gráfico de barras que muestra el número relativo de control de células MFICD3⁺, CD4⁺ y varios LED que encapsulan diferentes dosis de construcciones de ARNip de CD4 o Luciferasa. La Figura 7F es un gráfico de barras que muestra el nivel de expresión de GFP en células 293T transfectadas de manera estable con eGFP después de la transfección de una construcción siGFP usando LIPOFECTAMINE® o varios LED que contienen combinaciones de diferentes conjugados de dendrímico (G)-ciclodextrina (CD). Este gráfico mide la intensidad de fluorescencia media (MFI) de GFP para evaluar la capacidad de silenciamiento de los dendrímeros modificados que forman complejos con siGFP. El eje x debería leerse como sigue:

60 simulado: ARNip sin sentido
 LFA: control ARNip contra LFA
 G3: dendrímico PAMAM de 3^a generación no modificado
 G3 5X: dendrímico G3 con 1 ciclodextrina conjugada (G3-1CD)
 G3 5xd: G3 con 2 CD conjugadas (G3-2CD)
 65 G3 10x: G3 con 3 CD conjugadas (G3-3CD)
 G3 20x: G3 con 3,4 CD conjugada (G3-3,4CD)

- G4: dendrímero G4 sin modificaciones (G4)
 G4 5x: dendrímero G4 con 1 CD conjugada (G4-1CD)
 G4 5xd: dendrímero G4 con 1,3 CD conjugadas (G4-1,3CD)
 G4 10x: G4-3CD
- 5 G5: dendrímero de 5ª generación (G5) sin modificaciones
 G5 5x: G5-1CD
 G5 10x: G5-3CD
 G5 10x 0,5 mg: G5-3CD, se utilizan 500 µg en lugar de 200 µg en otros tratamientos
 G5 10x D: G5-2,5CD
- 10 G5 20x: G5-4CD

15 La Figura 8A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de MHC-SIINFEKL, células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) murinas. Células positivas para MHC-SIINFEKL después del tratamiento con liposomas que contienen ovoalbúmina sola (OVA), dendrímero solo, o una combinación de OVA y dendrímero. *p < 0,05 por prueba post de Bonferroni con ANOVA unidireccional. La Figura 8B es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de células positivas para MHC-SIINFEKL (por tinción 25.D16-PE) con varios controles y liposomas que incluyen uno o más de dendrímero (es decir, G5), antígeno (es decir, ovoalbúmina (OVA)), y modificaciones de la superficie (es decir, MPLA y/o CpG) como se marca. La formulación de partículas que contiene MPLA, OVA, G5 y CpG no se mostró, ya que encapsulaba una cantidad prohibitivamente baja de proteína OVA, y la normalización de los grupos de tratamiento por la cantidad de OVA tuvo como resultado toxicidad celular porque la concentración de partículas era más alta que la de otros grupos. La Figura 8C es un gráfico de barras que muestra la IL-6 (pg/ml) expresada a partir de células dendríticas de médula ósea (BMDC) tratadas con LED que presentan cantidades crecientes de CpG.

25 Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

30 “Nanolipogel”, como se usa en el presente documento, se refiere a una nanopartícula de núcleo-cubierta que tiene un núcleo de matriz polimérica, que contiene una molécula hospedadora, dentro de una cubierta liposómica, que puede ser unilamelar o bilamelar, opcionalmente reticulada.

35 “Molécula hospedadora”, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula o material que se asocia reversiblemente con un principio activo para formar un complejo. En realizaciones particulares, el hospedador es una molécula que forma un complejo de inclusión con un principio activo. Los complejos de inclusión se forman cuando un principio activo (es decir, el hospedador) o una porción de un principio activo se inserta en una cavidad de otra molécula, grupo de moléculas o material (es decir, el hospedador). La molécula hospedadora se selecciona de polisacáridos tales como amilosas, ciclodextrinas y otros compuestos cíclicos o helicoidales que contienen una pluralidad de anillos de aldosa, por ejemplo, compuestos formados a través de enlaces 1,4 y 1,6 de monosacáridos (como glucosa, fructosa y galactosa) y disacáridos (como sacarosa, maltosa y lactosa), criptandos, criptófanos, cavitandos, éteres corona, dendrímeros, resinas de intercambio iónico, calixarenos, valinomicinas, nigericinas, catenanos, policanos, carcerandos, cucurbiturilos, esferandos, nanotubos de carbono, fullerenos y materiales hospedantes a base de grafeno.

45 “Molécula pequeña”, como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas con un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 g/mol, más preferiblemente menos de aproximadamente 1500 g/mol, lo más preferiblemente menos de aproximadamente 1200 g/mol.

50 “Hidrogel”, como se usa en el presente documento, se refiere a una matriz polimérica hinchable en agua formada a partir de una red tridimensional de macromoléculas unidas por enlaces cruzados covalentes o no covalentes, que pueden absorber una cantidad sustancial de agua (en peso) para formar un gel.

55 “Nanopartícula”, como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a una partícula que tiene un diámetro de aproximadamente 10 nm hasta, pero sin incluir, aproximadamente 1 micrómetro, preferiblemente de 100 nm a aproximadamente 1 micrómetro. Las partículas pueden tener cualquier forma. Las nanopartículas que tienen una forma esférica se denominan generalmente “nanoesferas”.

60 El “peso molecular” como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a la longitud de cadena promedio relativa del polímero en masa, a menos que se especifique lo contrario. En la práctica, el peso molecular se puede estimar o caracterizar utilizando diversos métodos, incluida la cromatografía de permeación en gel (GPC) o la viscosimetría capilar. Los pesos moleculares de la GPC se expresan como el peso molecular promedio en peso (Mw) en oposición al peso molecular promedio en número (Mn). La viscosimetría capilar proporciona estimaciones del peso molecular como la viscosidad inherente determinada a partir de una solución de polímero diluido utilizando un conjunto particular de concentración, temperatura y condiciones de disolvente.

65 “Tamaño medio de partícula” como se usa en el presente documento, generalmente se refiere al tamaño medio

estadístico de partícula (diámetro) de las partículas en una población de partículas. El diámetro de una partícula esencialmente esférica puede referirse al diámetro físico o hidrodinámico. El diámetro de una partícula no esférica puede referirse preferentemente al diámetro hidrodinámico. Como se usa en la presente memoria, el diámetro de una partícula no esférica puede referirse a la distancia lineal más grande entre dos puntos en la superficie de la partícula. El tamaño medio de partícula se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica, como la dispersión dinámica de la luz.

“Monodisperso” y “distribución de tamaño homogénea”, se usan indistintamente en la presente memoria y describen una población de nanopartículas o micropartículas donde todas las partículas son del mismo tamaño o casi del mismo tamaño. Como se usa en la presente memoria, una distribución monodispersa se refiere a distribuciones de partículas en las que el 90 % de la distribución se encuentra dentro del 15 % del tamaño medio de partícula, más preferiblemente dentro del 10 % del tamaño medio de partícula, lo más preferiblemente dentro del 5 % del tamaño medio de partícula.

“Principio activo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia fisiológica o farmacológicamente activa que actúa localmente y/o sistémicamente en el cuerpo. Un principio activo es una sustancia que se administra a un paciente para el tratamiento (p.ej., agente terapéutico), prevención (es decir, agente profiláctico) o diagnóstico (por ejemplo, agente de diagnóstico) de una enfermedad o trastorno.

II. Nanolipogeles

Los nanolipogeles son nanopartículas de núcleo y cubierta que combinan las ventajas de los liposomas y de las partículas a base de polímeros para la administración sostenida de principios activos. Como se analiza con más detalle a continuación, normalmente, la cubierta externa protege la carga, proporciona biocompatibilidad y una superficie para la funcionalización con molécula(s) dirigida(s). La cubierta externa encapsula los componentes para que no se expongan hasta que se desee, por ejemplo, en respuesta a condiciones ambientales o estímulos, creando poblaciones de partículas reproducibles y monodispersas, y mediando la internalización en los tipos de células deseados. El núcleo interno, que puede ser un dendrímero u otro polímero, tiene funcionalidades separadas y aditivas a la cubierta externa. Por ejemplo, la cubierta interna permite la deposición secundaria de fármaco, vacuna o agente de imagen; aumenta la carga de componentes con diferentes propiedades fisicoquímicas en la partícula; permite la liberación sintonizable de contenidos de partículas; aumenta la disponibilidad citosólica de ADN/ARN, fármaco y/o proteína al alterar los endosomas, lo que conduce a una mejora en los efectos del fármaco, presentación de antígenos y transfección/silenciamiento.

Los nanolipogeles tienen un núcleo de matriz polimérica que contiene una o más moléculas hospedadoras. La matriz polimérica es preferiblemente un hidrogel, tal como un copolímero de bloque reticulado que contiene uno o más segmentos de poli(óxido de alquileno), tal como polietilenglicol, y uno o más segmentos de poliéster alifático, tal como ácido poliláctico. Una o más moléculas hospedadoras, como una ciclodextrina, dendrímero o resina de intercambio iónico, se dispersan dentro de la matriz polimérica. El núcleo de hidrogel está rodeado por una cubierta liposomal.

Los nanolipogeles pueden construirse para incorporar varios principios activos que posteriormente pueden liberarse de manera controlada. Los principios activos se pueden dispersar dentro de la matriz de hidrogel, asociados con una o más moléculas hospedadoras, dispersarse dentro de la cubierta liposomal, unirse covalentemente a la cubierta liposomal y combinaciones de los mismos. Los principios activos se pueden incorporar selectivamente en cada uno de estos lugares dentro del nanolipogel. Además, la tasa de liberación de principios activos de cada una de estas configuraciones regionales se puede ajustar de forma independiente. Debido a que cada una de estas localizaciones posee propiedades distintas, que incluyen el tamaño y la hidrofobia/hidrofilia, las entidades químicas incorporadas independientemente en cada una de estas localizaciones pueden diferir drásticamente con respecto al tamaño y la composición. Por ejemplo, los nanolipogeles pueden cargarse con una o más proteínas dispersas dentro de la matriz polimérica, así como con fármacos hidrófobos de molécula pequeña asociados con moléculas hospedadoras.

De esta forma, los nanolipogeles pueden proporcionar una liberación sostenida simultánea de agentes que difieren ampliamente en composición química y peso molecular. En un ejemplo no limitante, los nanolipogeles pueden cargarse tanto con un antígeno de molécula pequeña hidrófobo asociado con una molécula hospedadora como con un inmunoadyuvante, tal como una proteína inmunoestimuladora, dispersa dentro de la matriz polimérica. Estos nanolipogeles pueden proporcionar una liberación sostenida del antígeno junto con el adyuvante, a fin de optimizar una respuesta inmunitaria. En un ejemplo particular, la administración simultánea sostenida por nanolipogeles de una proteína inmunoestimuladora, interleucina-2 (IL-2), así como una molécula orgánica de bajo peso molecular, clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-terc-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina, un inhibidor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Esta construcción conduce a una respuesta antitumoral en un sistema murino que es muy superior a la que se puede lograr con la administración en solución de un agente solo o una combinación de ambos. Además, los nanolipogeles pueden modular favorablemente la biodistribución de uno o más principios activos encapsulados en el mismo.

Los nanolipogeles son normalmente de forma esférica, con tamaños de partícula promedio que varían entre

aproximadamente 50 nm y aproximadamente 1000 nm, más preferiblemente entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 300 nm, lo más preferiblemente entre aproximadamente 90 nm y aproximadamente 200 nm. En ciertas realizaciones, los nanolipogeles poseen un tamaño de partícula promedio entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 140 nm. Las partículas pueden ser no esféricas.

5 Dependiendo de la naturaleza de los lípidos presentes en la cubierta liposomal de los nanolipogeles, se pueden preparar nanolipogeles con una carga superficial positiva, negativa o casi neutra. En ciertas realizaciones, los nanolipogeles poseen una carga superficial casi neutra. En ciertas realizaciones, los nanolipogeles poseen un potencial ζ de entre aproximadamente 10 mV y aproximadamente -10 mV, más preferiblemente entre
10 aproximadamente 5 mV y aproximadamente -5 mV, más preferiblemente entre aproximadamente 3 mV y aproximadamente -3 mV, lo más preferiblemente entre aproximadamente 2 mV y aproximadamente -2 mV.

A. Núcleo

15 El núcleo de nanolipogel se forma a partir de una matriz polimérica y una o más moléculas hospedadoras. El núcleo de nanolipogel puede incluir además uno o más principios activos. Los principios activos pueden formar complejos con las moléculas hospedadoras, dispersarse con la matriz polimérica o combinaciones de los mismos.

1. Matriz polimérica

20 La matriz polimérica de los nanolipogeles puede formarse a partir de uno o más polímeros o copolímeros. Al variar la composición y la morfología de la matriz polimérica, se pueden lograr varias características de liberación controlada, lo que permite la administración de dosis constantes moderadas de uno o más principios activos durante períodos prolongados de tiempo,

25 La matriz polimérica se puede formar a partir de polímeros no biodegradables o biodegradables; sin embargo, preferiblemente, la matriz polimérica es biodegradable. La matriz polimérica puede seleccionarse para degradarse durante un período de tiempo que varía de un día a un año, más preferiblemente de siete días a 26 semanas, más preferiblemente de siete días a 20 semanas, lo más preferiblemente de siete días a 16 semanas.

30 En general, se prefieren los polímeros sintéticos, aunque pueden usarse polímeros naturales. Los polímeros representativos incluyen poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-ácidos co-glicólicos), polihidroxialcanoatos tales como poli3-hidroxi butirato o poli4-hidroxi butirato; policaprolactonas; poli(ortoésteres); polianhídridos; poli(fosfazenos); poli(lactida-co-caprolactonas); poli(glicólido-co-caprolactonas); policarbonatos tales como policarbonatos de tirosina; poliamidas (incluidas las poliamidas sintéticas y naturales), polipéptidos y
35 poli(aminoácidos); poliésteramidas; otros poliésteres biocompatibles; poli(dioxanonas); poli(alquilatos de alquileño); poliéteres hidrófilos; poliuretanos; poliésteres; poliacetales; policianoacrilatos; polisiloxanos; copolímeros de poli(oxietileno)/poli(oxipropileno); policetales; polifosfatos; polihidroxivaleratos; oxalatos de polialquileño; succinatos de polialquileño; poli(ácidos maleicos), alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona; poli(óxidos de alquileño) tales como polietilenglicol (PEG); celulosas derivativizadas tales como alquilcelulosas (por ejemplo, metilcelulosa), hidroxialquilcelulosas (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa), éteres de celulosa, éteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ácido acrílico, ácido metacrílico o copolímeros o derivados de los mismos, incluidos ésteres, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo),
40 poli(acrilato de metilo), poli(isopropilo acrilato), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo) (denominados conjuntamente en la presente memoria "ácidos poliacrílicos"), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos.

50 Como se usa en el presente documento, los "derivados" incluyen polímeros que tienen sustituciones, adiciones de grupos químicos y otras modificaciones a las cadenas principales poliméricas descritas anteriormente, fabricadas rutinariamente por los expertos en la materia. Los polímeros naturales, que incluyen proteínas como la albúmina, el colágeno, la gelatina, las prolaminas, como la zeína, y los polisacáridos como el alginato y la pectina, también pueden incorporarse a la matriz polimérica. Si bien se puede usar varios polímeros para formar la matriz polimérica, en general, la matriz polimérica resultante será un hidrogel. En ciertos casos, cuando la matriz polimérica contiene un polímero natural, el polímero natural es un biopolímero que se degrada por hidrólisis, como un polihidroxialcanoato.

60 En realizaciones preferidas, la matriz polimérica contiene uno o más polímeros reticulables. Preferiblemente, los polímeros reticulables contienen uno o más grupos fotopolimerizables, lo que permite la reticulación de la matriz polimérica después de la formación del nanolipogel. Los ejemplos de grupos fotopolimerizables adecuados incluyen grupos vinilo, grupos acrilato, grupos metacrilato y grupos acrilamida. Los grupos fotopolimerizables, cuando están presentes, pueden incorporarse dentro de la cadena principal de los polímeros reticulables, dentro de una o más de las cadenas laterales de los polímeros reticulables, en uno o más de los extremos de los polímeros reticulables, o combinaciones de los mismos.

65 La matriz polimérica se puede formar a partir de polímeros que tienen varios pesos moleculares, para formar

nanolipogeles con propiedades, que incluyen velocidades de liberación de fármacos, óptimas para aplicaciones específicas. Generalmente, los polímeros que forman la matriz polimérica poseen pesos moleculares promedio de aproximadamente 500 Da y 50 kDa. En los casos en que la matriz polimérica se forma a partir de polímeros no reticulables, los polímeros poseen normalmente pesos moleculares promedio que varían entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 70 kDa, lo más preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa. En los casos en que la matriz polimérica se forma a partir de polímeros reticulables, los polímeros poseen normalmente pesos moleculares promedio más bajos que varían entre aproximadamente 500 Da y aproximadamente 25 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 10 kDa, lo más preferiblemente entre aproximadamente 3 kDa y aproximadamente 6 kDa. En realizaciones particulares, la matriz polimérica se forma a partir de un polímero reticulable que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5 kDa.

En algunas realizaciones, la matriz polimérica se forma a partir de un polímero de poli(óxido de alquileo) o un copolímero de bloques que contiene uno o más segmentos de poli(óxido de alquileo). El polímero de poli(óxido de alquileo) o los segmentos de polímero de poli(óxido de alquileo) pueden contener entre 8 y 500 unidades repetidas, más preferiblemente entre 40 y 300 unidades repetidas, lo más preferiblemente entre 50 y 150 unidades repetidas. Los poli(óxidos de alquileo) adecuados incluyen polietilenglicol (también denominado óxido de polietileno o PEG), polipropileno 1,2-glicol, poli(óxido de propileno), polipropileno 1,3-glicol y copolímeros de los mismos.

En algunas realizaciones, la matriz polimérica se forma a partir de un poliéster alifático o un copolímero de bloques que contiene uno o más segmentos de poliéster alifático. Preferiblemente, los segmentos de poliéster o poliéster son poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) PGA o poli(láctida-co-glicólido) (PLGA).

En realizaciones preferidas, la matriz polimérica se forma a partir de un copolímero de bloques que contiene uno o más segmentos de poli(óxido de alquileo), uno o más segmentos de poliéster alifático, y opcionalmente uno o más grupos fotopolimerizables. En estos casos, el uno o más segmentos de poli(óxido de alquileo) imbuyen al polímero con la hidrofiliidad necesaria, de modo que la matriz de polímero resultante forma un hidrogel adecuado, mientras que los segmentos de poliéster proporcionan una matriz polimérica con hidrofobicidad/hidrofiliidad ajustable y/o las características de degradación deseadas *in vivo*.

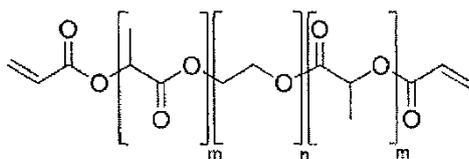
La tasa de degradación de los segmentos de poliéster, y a menudo la tasa de liberación del fármaco correspondiente, puede variar desde días (en el caso del PGA puro) hasta meses (en el caso del PLA puro), y puede manipularse fácilmente variando la proporción entre PLA y PGA en los segmentos de poliéster. Además, los poli(óxidos de alquileo), como PEG, y los poliésteres alifáticos, como PGA, PLA y PLGA, se han establecido como seguros para su uso en humanos; estos materiales se han utilizado en aplicaciones clínicas humanas, incluido el sistema de administración de fármacos, durante más de 30 años.

En ciertas realizaciones, la matriz polimérica se forma a partir de un copolímero de tres bloques que contiene un segmento central de poli(óxido de alquileo), segmentos adyacentes de poliéster alifático unidos a cada extremo del segmento central de poli(óxido de alquileo) y uno o más grupos fotopolimerizables. Preferiblemente, el segmento central de poli(óxido de alquileo) es PEG, y los segmentos de poliésteres alifáticos son PGA, PLA o PLGA.

Generalmente, el peso molecular promedio del segmento central de poli(óxido de alquileo) es mayor que el peso molecular promedio de los segmentos de poliéster adyacentes. En ciertas realizaciones, el peso molecular promedio del segmento central de poli(óxido de alquileo) es al menos tres veces mayor que el peso molecular promedio de uno de los segmentos de poliéster adyacentes, más preferiblemente al menos cinco veces mayor que el peso molecular promedio de uno de los segmentos de poliéster adyacentes, lo más preferiblemente al menos diez veces mayor que el peso molecular promedio de uno de los segmentos de poliéster adyacentes.

En algunos casos, el segmento central de poli(óxido de alquileo) posee un peso molecular promedio que varía entre aproximadamente 500 Da y aproximadamente 10.000 Da, más preferiblemente entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 7.000 Da, lo más preferiblemente entre aproximadamente 2.500 Da y aproximadamente 5.000 Da. En realizaciones particulares, el peso molecular promedio del segmento central de poli(óxido de alquileo) es de aproximadamente 4.000 Da. Normalmente, cada segmento de poliéster adyacente posee un peso molecular promedio que varía entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 3.500 Da, más preferiblemente entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 1.000 Da, lo más preferiblemente entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 500 Da.

En una realización preferida, la matriz polimérica se forma a partir del copolímero de tres bloques que se muestra a continuación.



donde m y n son, independientemente para cada aparición, números enteros entre 1 y 500, más preferiblemente entre 10 y 150.

5 Los ejemplos de polímeros naturales preferidos incluyen proteínas tales como albúmina, colágeno, gelatina y prolaminas, por ejemplo, zeína y polisacáridos tales como alginato, derivados de celulosa y polihidroxicanoatos, por ejemplo, polihidroxitirato. La estabilidad *in vivo* de las micropartículas se puede ajustar durante la producción mediante el uso de polímeros como poli(lactida-co-glicólido) copolimerizada con polietilenglicol (PEG). Si el PEG se
10 expone en la superficie externa, puede aumentar el tiempo de circulación de estos materiales debido a la hidrofilia del PEG.

Los ejemplos de polímeros no biodegradables preferidos incluyen etilvinilacetato, ácido poli(met) acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

15 La matriz también puede estar hecha de polímeros de tipo gel, como el alginato, producidos mediante técnicas tradicionales de gelificación iónica. Los polímeros se disuelven primero en una solución acuosa, se mezclan con sulfato de bario o algún agente bioactivo, y luego se extruyen a través de un dispositivo de formación de microgotas, que en algunos casos emplea un flujo de gas nitrógeno para romper la gota. Un baño de endurecimiento iónico agitado lentamente (aproximadamente 100-170 RPM) se coloca debajo del dispositivo de extrusión para atrapar las microgotas que se forman. Las micropartículas se dejan incubar en el baño durante veinte a treinta minutos para dar
20 tiempo suficiente para que ocurra la gelificación. El tamaño de partícula de las micropartículas se controla utilizando extrusoras de varios tamaños o variando los caudales de nitrógeno gaseoso o de solución de polímero. Las micropartículas de quitosano se pueden preparar disolviendo el polímero en solución ácida y reticulándolo con tripolifosfato. Las micropartículas de carboximetilcelulosa (CMC) se pueden preparar disolviendo el polímero en solución ácida y precipitando la micropartícula con iones de plomo. En el caso de polímeros cargados negativamente (por ejemplo, alginato, CMC), se pueden unir iónicamente ligandos cargados positivamente (por ejemplo, polilisina, polietilenimina) de diferentes pesos moleculares.

30 Quizás los más utilizados son los poliésteres alifáticos, específicamente el poli(ácido láctico) (PLA) hidrófobo, el poli(ácido glicólico) PGA más hidrófilo y sus copolímeros, poli(lactida-co-glicólido) (PLGA). La tasa de degradación de estos polímeros, y a menudo la tasa de liberación del fármaco correspondiente, puede variar desde días (PGA) hasta meses (PLA) y se manipula fácilmente variando la relación entre PLA y PGA. En segundo lugar, se ha establecido la compatibilidad fisiológica de PLGA y sus homopolímeros PGA y PLA para un uso seguro en humanos; estos materiales tienen una historia de más de 30 años en diversas aplicaciones clínicas humanas, incluidos los
35 sistemas de administración de fármacos. Las nanopartículas de PLGA se pueden formular de varias maneras que mejoran la farmacocinética y la biodistribución del fármaco al tejido objetivo mediante direccionamiento pasivo o activo. Las micropartículas están diseñadas para liberar moléculas para ser encapsuladas o unidas durante un período de días a semanas. Los factores que influyen en la duración de la liberación incluyen el pH del medio circundante (mayor tasa de liberación a pH 5 y menos debido a la hidrólisis catalizada por ácido de PLGA) y la composición del polímero. Los poliésteres alifáticos difieren en hidrofobicidad y eso a su vez afecta a la tasa de degradación. Específicamente, el poli(ácido láctico) (PLA) hidrófobo, más poli(ácido glicólico) (PGA) hidrófilo y sus copolímeros, poli(lactida-co-glicólido) (PLGA) tienen diferentes tasas de liberación. La tasa de degradación de estos polímeros, y a menudo la tasa de liberación del fármaco correspondiente, puede variar de días (PGA) a meses (PLA)
45 y se manipula fácilmente variando la relación entre PLA y PGA.

2. Moléculas hospedadoras

Las moléculas hospedadoras son moléculas o materiales que se asocian reversiblemente con un principio activo para formar un complejo. En virtud de su capacidad para formar reversiblemente complejos con principios activos, las moléculas hospedadoras pueden funcionar para controlar la liberación de un principio activo complejo *in vivo*.

En algunos casos, la molécula hospedadora es una molécula que forma un complejo de inclusión con un principio activo. Los complejos de inclusión se forman cuando un principio activo (es decir, el hospedador) o una porción de un principio activo se inserta en una cavidad de otra molécula, grupo de moléculas o material (es decir, el hospedador). Normalmente, la molécula hospedadora se asocia con la molécula hospedadora sin afectar al marco o la estructura del hospedador. Por ejemplo, en el caso de los complejos de inclusión, el tamaño y la forma de la cavidad disponible en la molécula hospedadora permanecen sustancialmente inalterados como consecuencia de la formación del complejo.

60 La molécula hospedadora se selecciona de polisacáridos tales como amilosas, ciclodextrinas y otros compuestos

cíclicos o helicoidales que contienen una pluralidad de anillos de aldosa, por ejemplo, compuestos formados a través de enlaces 1,4 y 1,6 de monosacáridos (como glucosa, fructosa y galactosa) y disacáridos (como sacarosa, maltosa y lactosa). Otros ejemplos de compuestos hospedantes a modo de ejemplo incluyen criptandos, criptófanos, cavitandos, éteres corona, dendrímeros, resinas de intercambio iónico, calixarenos, valinomicinas, nigericinas, catenanos, policatenanos, carcerandos, cucurbiturilos, esferandos, nanotubos de carbono, fullerenos y/o materiales a base de grafeno. Los nanotubos de carbono (CNT) son alótropos de carbono con una nanoestructura cilíndrica. Los nanotubos son miembros de la familia estructural del fullereno, que también incluye las *buckyballs* esféricas, y los extremos de un nanotubo pueden estar cubiertos con un hemisferio de la estructura *buckyball*. Su nombre se deriva de su estructura larga y hueca con las paredes formadas por láminas de carbono de un átomo de espesor, llamadas grafeno. Estas hojas se enrollan en ángulos específicos y discretos ("quirales"), y la combinación del ángulo de rodadura y el radio decide las propiedades de los nanotubos. Los nanotubos se pueden clasificar como nanotubos de pared simple (SWNT) y nanotubos de pared múltiple (MWNT). Los nanotubos y/o fullerenos pueden servir como hospedadores, por ejemplo, encapsulando o atrapando el material a administrar (es decir, el hospedador) dentro de los tubos o fullerenos. Como alternativa, el exterior y/o el interior de los tubos y/o los fullerenos pueden funcionalizarse con grupos funcionales que pueden formar complejos con el hospedador a administrar. La formación de complejos incluye, entre otras, interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals e interacciones pi-pi, como el apilamiento pi.

Los grafenos también son un alótropo de carbono. La estructura del grafeno es una lámina plana de un átomo de espesor de átomos de carbono unidos mediante enlaces sp^2 que están densamente empaquetados en una red cristalina de panal. El grafeno es el elemento estructural básico de algunos alótropos de carbono, incluidos el grafito, el carbón, los nanotubos de carbono y los fullerenos. El hospedador a ser administrado puede asociarse y/o formar complejo con grafeno o grafeno funcionalizado como se describió anteriormente para nanotubos y fullerenos.

El material hospedador también puede ser un material inorgánico, que incluye, pero no se limitan a, fosfatos inorgánicos y sílice.

Las moléculas hospedadoras adecuadas se seleccionan generalmente para su incorporación en nanolipogel en vista de la identidad del (de los) agente(s) activo(s) a administrar y el perfil deseado de liberación del fármaco. Con el fin de formar un complejo con el principio activo que se administra, la molécula hospedadora generalmente se selecciona para ser complementaria del principio activo tanto en términos estéricos (tamaño) como electrónicos (carga y polaridad). Por ejemplo, en el caso de las moléculas hospedadoras que forman complejos de inclusión con el principio activo que se administrará, la molécula hospedadora normalmente tendrá una cavidad de tamaño apropiado para incorporar el principio activo. Además, la molécula hospedadora posee normalmente una cavidad de hidrofobicidad/hidrofilia apropiada para promover la formación de complejos con el principio activo. La fuerza de la interacción huésped-hospedador influirá en el perfil de liberación del fármaco del principio activo desde el nanolipogel, con interacciones más fuertes huésped-hospedador que generalmente producen una liberación más prolongada del fármaco.

Generalmente, las moléculas hospedadoras se dispersan dentro de la matriz polimérica que forma el núcleo de nanolipogel. En algunos casos, una o más moléculas hospedadoras están acopladas covalentemente a la matriz polimérica. Por ejemplo, las moléculas hospedadoras pueden funcionalizarse con uno o más grupos funcionales reactivos colgantes que reaccionan con la matriz polimérica. En realizaciones particulares, las moléculas hospedadoras contienen uno o más grupos funcionales reactivos colgantes que reaccionan con la matriz polimérica para reticular la matriz polimérica. Los ejemplos de grupos funcionales reactivos adecuados incluyen metacrilatos, acrilatos, grupos vinilo, epóxidos, tiiranos, azidas y alquinos.

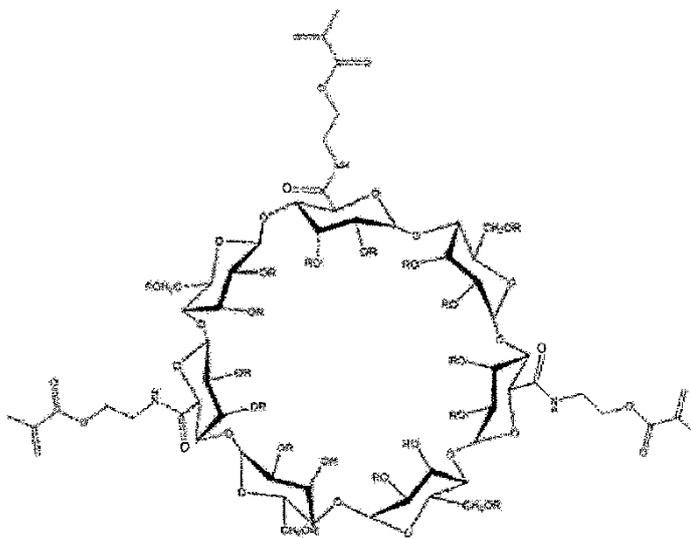
En ciertas realizaciones, la molécula hospedadora es una ciclodextrina. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que contienen seis (α -ciclodextrina), siete (β -ciclodextrina), ocho (γ -ciclodextrina) o más residuos de glucosa con enlaces α -(1,4). Los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas están orientados hacia el exterior del anillo, mientras que el oxígeno glucosídico y dos anillos de los átomos de hidrógeno no intercambiables se dirigen hacia el interior de la cavidad. Como resultado, las ciclodextrinas poseen una cavidad interna hidrófoba combinada con un exterior hidrófilo. Tras la combinación con un principio activo hidrófobo, el principio activo (es decir, el hospedador) se inserta en el interior hidrófobo de la ciclodextrina (es decir, el hospedador).

La ciclodextrina puede modificarse químicamente de modo que algunos o todos los grupos hidroxilo primarios o secundarios del macrociclo, o ambos, estén funcionalizados con uno o más grupos colgantes. Los grupos colgantes pueden ser grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar con la matriz polimérica, tales como metacrilatos, acrilatos, grupos vinilo, epóxidos, tiiranos, azidas, alquinos y combinaciones de los mismos. Los grupos colgantes también pueden servir para modificar la solubilidad de la ciclodextrina. Ejemplos de grupos de este tipo incluyen sulfínico, sulfónico, fosfato, acilo y grupos alquilo C_1 - C_{12} opcionalmente sustituidos con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) grupos hidroxilo, carboxilo, carbonilo, acilo, oxo y oxo. Los métodos para modificar estos residuos de alcohol son conocidos en la técnica, y están comercializados muchos derivados de ciclodextrina.

Los ejemplos de ciclodextrinas adecuadas incluyen α -ciclodextrina; β -ciclodextrina; γ -ciclodextrina; metil α -ciclodextrina; metil β -ciclodextrina; metil γ -ciclodextrina; etil β -ciclodextrina; butil α -ciclodextrina; butil β -ciclodextrina;

butil γ -ciclodextrina; pentil γ -ciclodextrina; hidroxietil β -ciclodextrina; hidroxietil γ -ciclodextrina; 2-hidroxipropil- α -ciclodextrina; 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; 2-hidroxipropil γ -ciclodextrina; 2-hidroxibutil- β -ciclodextrina; acetil α -ciclodextrina; acetil β -ciclodextrina; acetil γ -ciclodextrina; propionil β -ciclodextrina; butiril β -ciclodextrina; succinil α -ciclodextrina; succinil β -ciclodextrina; succinil γ -ciclodextrina; benzoil β -ciclodextrina; palmitil β -ciclodextrina; toluenosulfonil β -ciclodextrina; acetil metil β -ciclodextrina; acetil butil β -ciclodextrina; glucosil α -ciclodextrina; glucosil β -ciclodextrina; glucosil γ -ciclodextrina; maltosil α -ciclodextrina; maltosil β -ciclodextrina; maltosil γ -ciclodextrina; α -ciclodextrina carboximetiléter; β -ciclodextrina carboximetiléter; γ -ciclodextrina carboximetiléter; carboximetil β -ciclodextrina; éster fosfato de α -ciclodextrina; éster fosfato de β -ciclodextrina; éster fosfato γ -ciclodextrina; 3-trimetilamonio-2-hidroxipropil- β -ciclodextrina; sulfobutil éter β -ciclodextrina; carboximetil α -ciclodextrina; carboximetil β -ciclodextrina; carboximetil γ -ciclodextrina y sus combinaciones.

Las ciclodextrinas preferidas incluyen α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas y γ -ciclodextrinas funcionalizadas con uno o más grupos de acrilato o metacrilato colgantes. En una realización particular, la molécula hospedadora es una β -ciclodextrina funcionalizada con múltiples grupos metacrilato. A continuación se ilustra un ejemplo de una molécula hospedadora de este tipo, en la que R representa un grupo alquilo C_1 - C_6 .



Como otro ejemplo, la molécula hospedadora también puede ser un material que se asocie temporalmente con un principio activo mediante interacciones iónicas. Por ejemplo, las resinas de intercambio iónico convencionales conocidas en la técnica para su uso en la liberación controlada de fármacos pueden servir como moléculas hospedadoras. Ver, por ejemplo, Chen et al. "Evaluation of ion-exchange microspheres as carriers for the anticancer drug doxorubicin: in vitro studies". J. Pharm. Pharmacol 44(3): 211-215 (1992) y Farag et al. "Rate of release of organic carboxylic acids from ion exchange resins" J. Pharm. Sci. 77(10): 872-875 (1988).

A modo de ejemplo, cuando el principio activo que se administra es una especie catiónica, las resinas de intercambio iónico adecuadas pueden incluir un grupo de ácido sulfónico (o grupo de ácido sulfónico modificado) o un grupo de ácido carboxílico modificado opcionalmente en un armazón fisiológicamente aceptable. De manera similar, cuando el principio activo es una especie aniónica, las resinas de intercambio iónico adecuadas pueden incluir grupos a base de amina (por ejemplo, trimetilamina para una interacción fuerte, o dimetiletanolamina para una interacción más débil). Los polímeros catiónicos, como la polietilimina (PEI), pueden funcionar como moléculas hospedadoras para oligonucleótidos complejos como el ARNip.

En otros casos, la molécula hospedadora es un dendrímero, como un dendrímero de poli(amidoamina) (PAMAM). Los dendrímeros catiónicos y aniónicos pueden funcionar como materiales hospedadores al asociarse iónicamente con principios activos, como se describió anteriormente. Además, los dendrímeros de tamaño mediano, como los dendrímeros PAMAM de la tercera y cuarta generación, pueden poseer espacios vacíos internos que pueden acomodar principios activos, por ejemplo, mediante la formación de complejos de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, la molécula hospedadora es un dendrímero conjugado con una ciclodextrina. En algunas realizaciones, la(s) ciclodextrina(s) protegen a las aminas primarias de dendrímero. Los dendrímeros y ciclodextrinas adecuados se han analizado previamente. El dendrímero no modificado (es decir, el dendrímero PAMAM de 4ª generación (G4)) fue empíricamente mejor en la disrupción endosómica que el dendrímero conjugado con ciclodextrina (CD) (ver los ejemplos a continuación). Sin estar limitado por la teoría, se cree que los grupos de amina terminal en los dendrímeros PAMAM proporcionan amortiguación endosómica y alteran los endosomas por el efecto de esponja protónica. En consecuencia, un aumento de la CD tiene como resultado una disminución de la disrupción endosómica. Como se describe en los siguientes Ejemplos, se pueden usar diferentes combinaciones de

dendrimeros y ciclodextrinas para modular la eficiencia de transfección y el nivel de disrupción endosómica en la célula.

- 5 Preferiblemente, la una o más moléculas hospedadoras están presentes en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 40 % p/p de la matriz polimérica, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % p/p de la formulación global.

3. Principios activos

- 10 Los principios activos que se administrarán incluyen agentes terapéuticos, nutricionales, de diagnóstico y profilácticos. Los principios activos pueden ser principios activos de molécula pequeña o biomacromoléculas, tales como proteínas, polipéptidos o ácidos nucleicos. Los principios activos de molécula pequeña adecuados incluyen compuestos orgánicos y organometálicos. Los principios activos de molécula pequeña pueden ser un compuesto hidrófilo, hidrófobo o anfifílico.

- 15 Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden incorporar en nanolipogeles incluyen antígenos tumorales, epítopos de linfocitos T CD4+, citocinas, agentes quimioterapéuticos, radionúclidos, inhibidores de la transducción de señales de molécula pequeña, antenas fototérmicas, anticuerpos monoclonales, moléculas de señalización de peligro inmunológico, otras inmunoterapias, enzimas, antibióticos, antivirales (especialmente inhibidores de la proteasa solos o en combinación con nucleósidos para el tratamiento del VIH o la hepatitis B o C), antiparasitarios (helmintos, protozoos), factores de crecimiento, inhibidores del crecimiento, hormonas, antagonistas hormonales, anticuerpos y fragmentos bioactivos de los mismos (incluidos los humanizados, cadenas simples y anticuerpos quiméricos), formulaciones de antígenos y vacunas (incluidos adyuvantes), fármacos peptídicos, antiinflamatorios, inmunomoduladores (incluidos ligandos que se unen a los receptores tipo Toll (incluidos, pero no se limitan a, oligonucleótidos CpG) para activar el sistema inmunitario innato, moléculas que movilizan y optimizan el sistema inmunitario adaptativo, moléculas que activan o regulan al alza la acción de los linfocitos T citotóxicos, los linfocitos citolíticos naturales y los linfocitos T cooperadores, y las moléculas que desactivan o regulan a la baja los linfocitos T supresores o reguladores), agentes que promueven la absorción de nanolipogeles en las células (incluidas las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno), nutracéuticos como vitaminas y fármacos oligonucleotídicos (incluidos ADN, ARN, antisentido, aptámeros, ARN de interferencia pequeños, ribozimas, secuencias de guía externas para ribonucleasa P y agentes formadores de triplex).

- 35 Ejemplos de agentes de diagnóstico incluyen moléculas paramagnéticas, compuestos fluorescentes, moléculas magnéticas y radionúclidos, agentes de imagen de rayos X y agentes de contraste.

- 40 En ciertas realizaciones, el nanolipogel incluye uno o más agentes anticancerígenos. Los agentes anticancerígenos representativos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, dacarbazina, lomustina, carmustina, procarbazona, clorambucilo e ifosfamida), antimetabolitos (como fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, metotrexato, citosina arabinósido, fludarabina y floxuridina), antimitóticos (incluidos taxanos como paclitaxel y docetaxel y alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), antraciclina (incluida doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina y epirubicina, así como actinomicinas como la actinomicina D), antibióticos citotóxicos (incluidos mitomicina, plicamicina y bleomicina), inhibidores de la topoisomerasa (incluidas camptotecinas como irinotecán y topotecán, así como derivados de epipodofilotoxinas, como amsacrina, etopósido fosfato y tenipósido), anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tal como bevacizumab (AVASTIN®), otros compuestos anti-VEGF; talidomida (THALOMID®) y derivados de la misma como lenalidomida (REVLIMID®); endostatina; angiostatina; inhibidores del receptor tirosina quinasa (RTK) tales como sunitinib (SUTENT®); inhibidores de la tirosina quinasa tales como sorafenib (Nexavar®), erlotinib (Tarceva®), pazopanib, axitinib y lapatinib; inhibidores del factor de crecimiento transformante α o del factor de crecimiento transformante β y anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico, como panitumumab (VECTIBIX®) y cetuximab (ERBITUX®).

- 55 En ciertas realizaciones, el nanolipogel incluye uno o más agentes inmunomoduladores. Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen citocinas, xantinas, interleucinas, interferones, oligodesoxinucleótidos, glucanos, factores de crecimiento (p. ej., TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF), hormonas como estrógenos (diétilstilbestrol, estradiol), andrógenos (testosterona, HALOTESTIN®) (fluoximesterona), progestinas (MEGACE® (acetato de megestrol), PROVERA® (acetato de medroxiprogesterona)) y corticosteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

- 60 Los ejemplos de adyuvantes inmunológicos que pueden asociarse con las partículas incluyen, pero no se limitan a, ligandos de TLR, ligandos del receptor de lectina tipo C, ligandos del receptor tipo NOD, ligandos de RLR y ligandos de RAGE. Los ligandos de TLR pueden incluir lipopolisacáridos (LPS) y derivados de los mismos, así como lípido A y derivados que incluyen, pero no se limitan a, monofosforil lípido A (MPL), glicolpiranosil lípido A, PET-lípido A y 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A. En una realización específica, el adyuvante inmunológico es MPL. En otra realización, el adyuvante inmunológico es LPS. Los ligandos de TLR también pueden incluir, pero no se limitan a, ligandos de TLR3 (p. ej., ácido polinosínico-policitidílico (poli(I:C)), ligandos de TLR7 (p. ej., imiquimod y resiquimod) y ligandos de TLR9.

El nanolipogel también puede incluir antígenos y/o adyuvantes (es decir, moléculas que mejoran una respuesta inmunitaria). Las vacunas basadas en péptidos, proteínas y ADN pueden usarse para inducir inmunidad frente a diversas enfermedades o afecciones. La inmunidad celular es necesaria para detectar y destruir las células infectadas por virus. La mayoría de las vacunas tradicionales (por ejemplo, las vacunas a base de proteínas) solo pueden inducir inmunidad humoral. La vacuna a base de ADN representa un medio único para vacunar contra un virus o parásito porque una vacuna a base de ADN puede inducir inmunidad humoral y mediada por células. Además, las vacunas a base de ADN son potencialmente más seguras que las vacunas tradicionales. Las vacunas de ADN son relativamente más estables y más rentables para la fabricación y el almacenamiento. Las vacunas de ADN consisten en dos componentes principales, vehículos de ADN (o vehículos de administración) y ADN que codifican antígenos. Los vehículos de ADN protegen el ADN de la degradación y pueden facilitar la entrada de ADN a tejidos o células específicos y la expresión a un nivel eficiente.

En ciertas realizaciones, el núcleo de nanolipogel contiene dos o más principios activos. En realizaciones preferidas, el núcleo de nanolipogel contiene tanto un principio activo hidrófobo de molécula pequeña, preferiblemente asociado con una o más moléculas hospedadoras adecuadas, como un principio activo hidrófilo disperso dentro de la matriz polimérica. En realizaciones particulares, el principio activo hidrófilo es una proteína, tal como una citocina terapéutica. Al incorporar un principio activo hidrófobo en asociación con una molécula hospedadora y una molécula hidrófila dispersa dentro de la matriz polimérica, se puede lograr la liberación controlada de dos o más principios activos, incluidos dos o más principios activos con características fisicoquímicas variadas (como solubilidad, hidrofobicidad/hidrofilicidad, peso molecular, y combinaciones de los mismos).

En una realización preferida demostrada por los ejemplos, la molécula hospedadora se usa para administrar compuestos de bajo peso molecular, como un quimioterapéutico, donde la molécula hospedadora retrasa la liberación del compuesto de bajo peso molecular, y un compuesto hidrófilo más grande, como una citocina, para que la liberación de ambas moléculas ocurra durante un período de tiempo similar.

B. Componentes de la cubierta

Los nanolipogeles incluyen una cubierta liposómica compuesta de una o más monocapas lipídicas concéntricas o bicapas lipídicas. La cubierta puede incluir además uno o más principios activos, moléculas de direccionamiento o combinaciones de las mismas.

1. Lípidos

Los nanolipogeles incluyen una cubierta liposómica compuesta de una o más monocapas lipídicas o bicapas lipídicas concéntricas. La composición de la cubierta liposomal puede variar para influir en la tasa de liberación de uno o más principios activos *in vivo*. Los lípidos también pueden reticularse covalentemente, si se desea, para alterar la liberación de fármacos *in vivo*.

La cubierta lipídica se puede formar a partir de una única bicapa lipídica (es decir, la cubierta puede ser unilamelar) o varias bicapas lipídicas concéntricas (es decir, la cubierta puede ser multilamelar). La cubierta lipídica puede formarse a partir de un solo lípido; sin embargo, en realizaciones preferidas, la cubierta lipídica se forma a partir de una combinación de más de un lípido. Los lípidos pueden ser lípidos neutros, aniónicos o catiónicos a pH fisiológico.

Los lípidos neutros y aniónicos adecuados incluyen esteroides y lípidos tales como colesterol, fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos y esfingolípidos. Los lípidos neutros y aniónicos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina (PC) (como PC de huevo, PC de soja), incluyendo 1,2-diacil-glicero-3-fosfolinas; fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol (PI); glicolípidos; esfingofosfolípidos, como la esfingomiélica; esfingoglicolípidos (también conocidos como glucósidos de 1-ceramilo), tales como galactopiranosido de ceramida, gangliósidos y cerebrósidos; ácidos grasos, esteroides que contienen un grupo ácido carboxílico tal como colesterol o derivados del mismo; y 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminas, incluyendo 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina o 1,2-dioleoilglicerilfosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina (DHPR), 1,2-diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y 1,2-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). También son adecuados los derivados de estos lípidos naturales (es decir, L- α -fosfatidilo derivado de tejido: yema de huevo, corazón, cerebro, hígado, soja) y/o sintéticos (por ej., 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfolinas saturadas e insaturadas, 1-acil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolinas, 1,2-diheptanoil-*sn*-glicero-3-fosfolina).

Los lípidos catiónicos adecuados incluyen sales de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio, también denominados lípidos TAP, por ejemplo como una sal metilsulfato. Los lípidos TAP adecuados incluyen, pero no se limitan a, DOTAP (dioleoil-), DMTAP (dimiristoil-), DPTAP (dipalmitoil-) y DSTAP (distearoil-). Otros lípidos catiónicos adecuados incluyen bromuro de dimetildioctadecil amonio (DDAB), 1,2-diaciloxi-3-trimetilamonio propanos, N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N-dimetilamina (DODAP), 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio propanos, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 1,2-dialquiloxi-3-dimetilamonio propanos, dioctadecilamidoglicilcilespermina (DOGS), 3-[N-(N',N'-dimetilamino-etano)carbamoil]colesterol (DC-Col); trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-(2-(espermincarboxamido)-etil)-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), β -alanil

colesterol, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), di-amidina C₁₄, cloruro de N-terc-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilamino-propionamida, cloruro de N-(alfa-trimetilamonioacetil) didodecil-D-glutamato (TMAG), cloruro de ditetradecanoil-N-(trimetilamonio-acetil) dietanolamina, 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER), y yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-, N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodiamonio, derivados del cloruro de 1-[2-(aciloxi)etil]2-alkil(alquenil)-3-(2-hidroxietil)-imidazolinio, como cloruro de 1-[2-(9(Z)-octadecenoiloxi)etil]-2-(8(Z)-heptadecenil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DOTIM) y cloruro de 1-[2-(hexadecanoiloxi)etil]-2-pentadecil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DPTIM) y derivados de 2,3-dialquiloiloxipropil amonio cuaternario que contienen un resto hidroxialquilo en la amina cuaternaria, por ejemplo, bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DORI), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DORIE), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxiopropil amonio (DORIE-HP), bromuro de 1,2-dioleil-oxipropil-3-dimetil-hidroxibutil amonio (DORIE-HB), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxipentil amonio (DORIE-Hpe), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DMRIE), bromuro de 1,2-dipalmitiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DPRIE), y bromuro de 1,2-disteriloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio (DSRIE).

15 Otros lípidos adecuados incluyen derivados PEGilados de los lípidos neutros, aniónicos y catiónicos descritos anteriormente. La incorporación de uno o más derivados de lípidos PEGilados en la cubierta de lípidos puede dar como resultado un nanolipogel que muestra cadenas de polietilenglicol en su superficie. Los nanolipogeles resultantes pueden poseer mayor estabilidad y tiempo de circulación *in vivo* en comparación con los nanolipogeles que carecen de cadenas de PEG en sus superficies. Los ejemplos de lípidos PEGilados adecuados incluyen 20 diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenglicol (DSPE-PEG), incluyendo DSPE PEG (2000 MW) y DSPE PEG (5000 MW), dipalmitoil-glicero-succinato-polietilenglicol (DPGS-PEG), estearil-polietilenglicol y colesteril-polietilenglicol.

En realizaciones preferidas, la cubierta lipídica está formada por una combinación de más de un lípido. En ciertas realizaciones, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de al menos tres lípidos. En realizaciones 25 particulares, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de fosfatidilcolina (PC), 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG), y colesterol.

En algunas realizaciones, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de uno o más fosfolípidos PEGilados y uno o más lípidos o esteroides adicionales. En ciertos casos, la relación molar entre uno o más lípidos PEGilados y 30 uno o más lípidos o esteroides adicionales varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:6, más preferiblemente de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:6, lo más preferiblemente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:5. En realizaciones particulares, la relación molar entre uno o más lípidos PEGilados y uno o más lípidos o esteroides adicionales es aproximadamente 1:4.

En algunas realizaciones, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de uno o más fosfolípidos y uno o más lípidos o esteroides adicionales. En ciertos casos, la relación molar de uno o más fosfolípidos a uno o más lípidos o 35 esteroides adicionales varía de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 6:1, más preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 6:1, lo más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 5:1. En realizaciones particulares, la relación molar de uno o más lípidos fosfoideos a uno o más lípidos o esteroides adicionales es aproximadamente 4:1.

En realizaciones preferidas, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), un fosfolípido PEGilado, tal como 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino 45 (polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG) y colesterol. En realizaciones particulares, la cubierta lipídica está formada por una mezcla de fosfatidilcolina, 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG) y colesterol en una relación molar 3: 1:1.

2. Moléculas de direccionamiento y las moléculas que disminuyen la captación por el RES

50 La superficie de los nanolipogeles, o el núcleo del hospedador, puede modificarse para facilitar el direccionamiento a través de la unión de moléculas de direccionamiento. Ejemplos de moléculas objetivo incluyen proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, lípidos, sacáridos o polisacáridos que se unen a uno o más objetivos asociados con un órgano, tejido, célula o matriz extracelular, o tipo específico de tumor o célula infectada. El grado de especificidad con el que se dirigen los nanolipogeles puede modularse mediante la selección de una molécula de direccionamiento con la 55 afinidad y especificidad apropiadas. Por ejemplo, un resto de direccionamiento puede ser un polipéptido, como un anticuerpo que reconoce específicamente un marcador tumoral que está presente exclusivamente o en cantidades más altas en una célula maligna (por ej., un antígeno tumoral). Las moléculas de direccionamiento adecuadas que pueden usarse para dirigir nanopartículas a células y tejidos de interés, así como los métodos de conjugación de moléculas objetivo con nanopartículas, son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Ruoslahti et al. Nat. Rev. 60 Cancer, 2:83-90 (2002) Las moléculas de direccionamiento también pueden incluir neuropilinas y moléculas de direccionamiento endotelial, integrinas, selectinas y moléculas de adhesión. Las moléculas de direccionamiento pueden unirse covalentemente a nanolipogeles usando varios métodos conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la cubierta liposomal incluye uno o más lípidos PEGilados. El PEG, u otro óxido de 65 polialquileno hidrófilo, evita la absorción de los lipogeles por el sistema reticuloendotelial ("RES"), prolongando así el tiempo de residencia *in vivo*.

La superficie de los nanolipogeles puede modificarse para facilitar el direccionamiento a través de la unión de moléculas de direccionamiento. Estas pueden ser proteínas, péptidos, moléculas de ácido nucleico, sacáridos o polisacáridos que se unen a un receptor u otra molécula en la superficie de una célula objetivo. El grado de especificidad se puede modular mediante la selección de la molécula de direccionamiento. Por ejemplo, los anticuerpos son muy específicos. Estos pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos, recombinantes o de cadena simple, muchos de los cuales están disponibles comercialmente o se obtienen fácilmente utilizando técnicas estándar. Las moléculas específicas de linfocitos T y los antígenos que están unidos por las células presentadoras de antígenos, así como las moléculas dirigidas a tumores, pueden unirse a la superficie del nanolipogel y/o a la molécula hospedadora. Las moléculas de direccionamiento pueden conjugarse con el extremo de una o más cadenas de PEG presentes en la superficie de la cubierta liposomal.

3. Principios activos

La cubierta de los nanolipogeles puede contener opcionalmente uno o más principios activos, incluyendo cualquiera de los principios activos descritos anteriormente.

Los principios activos hidrófobos, como las proteínas, pueden estar conectados covalentemente a la superficie del nanolipogel, mientras que los principios activos hidrófilos pueden estar conectados covalentemente a la superficie del nanolipogel o dispersarse dentro de la cubierta liposomal. En ciertas realizaciones, la cubierta liposomal incluye uno o más lípidos PEGilados. En estos casos, uno o más principios activos pueden conjugarse con el extremo de una o más cadenas de PEG presentes en la superficie de la cubierta liposomal. En realizaciones particulares, uno o más principios activos están conectados covalentemente a la superficie del nanolipogel a través de un grupo de enlace que se escinde en respuesta a un estímulo químico o físico externo, tal como un cambio en el pH ambiental, para desencadenar la liberación del principio activo en un lugar fisiológico deseado.

III. Métodos de fabricación, carga y composiciones farmacéuticas

A. Métodos de fabricación y carga

Un nanolipogel es una nanopartícula que combina las ventajas de los liposomas y las partículas a base de polímeros para la administración sostenida de ácidos nucleicos, proteínas y/o moléculas pequeñas. El nanolipogel puede estar en forma de esferas, discos, varillas u otras geometrías con diferentes relaciones de aspecto. La nanoesfera puede ser más grande, es decir, micropartículas. El nanolipogel está formado normalmente por polímeros sintéticos o naturales capaces de encapsular agentes mediante carga remota y propiedades ajustables para facilitar diferentes velocidades de liberación. Las velocidades de liberación se modulan variando la relación polímero/lípido de 0,05 a 5,0, más preferiblemente de 0,5 a 1,5.

Los nanolipogeles están diseñados para cargarse con agentes antes, durante o después de la formación y posteriormente funcionan como vehículos de liberación controlada para los agentes. El nanolipogel puede cargarse con más de un agente, de modo que posteriormente se logra la liberación controlada de la multiplicidad de agentes.

El nanolipogel se carga con uno o más primeros agentes durante la formación y uno o más segundos agentes después de la formación por el proceso de rehidratación del nanolipogel en presencia de los segundos agentes. Por ejemplo, el nanolipogel se carga con una molécula que sirve como adyuvante y el nanolipogel incorpora posteriormente uno o más antígenos objetivo después de la formación, para la liberación controlada de adyuvante junto con los antígenos. Como alternativa, el nanolipogel cargado con adyuvante se inserta en el sitio de un tumor en un paciente, el tumor se extirpa, el nanolipogel se carga con antígenos tumorales liberados y el nanolipogel libera los antígenos tumorales junto con el adyuvante en el cuerpo del paciente en una manera controlada.

En otra realización, el nanolipogel se carga con un antígeno, una molécula que sirve como adyuvante y una molécula de direccionamiento para las células presentadoras de antígeno, el nanolipogel es absorbido por las células presentadoras de antígeno y el antígeno se procesa y presenta adecuadamente a los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T citotóxicos para promover una respuesta inmunitaria mediada por células.

En otra realización más, el nanolipogel cargado con una molécula que sirve como adyuvante y una molécula de direccionamiento para las células presentadoras de antígeno se inserta en el sitio de un tumor en un paciente, se extirpa el tumor y se carga el nanolipogel con antígenos tumorales liberados, el nanolipogel es absorbido por las células presentadoras de antígeno y los antígenos tumorales liberados se procesan de manera apropiada y se presentan a los linfocitos T colaboradores y los linfocitos T citotóxicos para promover una respuesta inmunitaria mediada por células.

B. Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas incluyendo nanolipogeles. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para administración por vías de administración parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa

(IV) o subcutánea), transdérmica (ya sea de forma pasiva o con iontoforesis o electroporación) o transmucosa (nasal, vaginal, rectal o sublingual) o usando insertos bioerosionables y pueden formularse en formas farmacéuticas apropiadas para cada vía de administración.

- 5 En algunas realizaciones, las composiciones se administran sistémicamente, por ejemplo, por administración intravenosa o intraperitoneal, en una cantidad eficaz para la administración de las composiciones a las células objetivo. Otras vías posibles incluyen la transdérmica u oral.

10 En ciertas realizaciones, las composiciones se administran localmente, por ejemplo mediante inyección directamente en un sitio a tratar. En algunas realizaciones, las composiciones se inyectan o administran de otro modo directamente a uno o más tumores. Normalmente, la inyección local provoca una concentración localizada aumentada de las composiciones que es mayor que la que puede lograrse mediante administración sistémica. En algunas realizaciones, las composiciones se administran localmente a las células apropiadas usando un catéter o jeringa. Otros medios para administrar tales composiciones localmente a las células incluyen el uso de bombas de infusión (por ejemplo, de Alza Corporation, Palo Alto, California) o la incorporación de las composiciones en implantes poliméricos (ver, por ejemplo, P. Johnson y J. G. Lloyd-Jones, editores, Drug Delivery Systems (Chichester, Inglaterra: Ellis Horwood Ltd., 1987), que puede provocar una liberación sostenida de los nanolipogeles en el área inmediata del implante.

20 Los nanolipogeles pueden proporcionarse a la célula directamente, por ejemplo, al ponerlos en contacto con la célula, o indirectamente, como a través de la acción de cualquier proceso biológico. Por ejemplo, los nanolipogeles pueden formularse en un portador o vehículo fisiológicamente aceptable e inyectarse en un tejido o fluido que rodea la célula. Los nanolipogeles pueden atravesar la membrana celular por difusión simple, endocitosis o por cualquier mecanismo de transporte activo o pasivo.

25 A medida que se realicen más estudios, surgirá información sobre los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de diversas afecciones en varios pacientes, y el trabajador calificado ordinario, teniendo en cuenta el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, podrá determinar la dosis adecuada. La dosis seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento deseado. Generalmente se administran niveles de dosificación de 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal diariamente a los mamíferos. En general, para inyección intravenosa o infusión, la dosis puede ser menor. Generalmente, la cantidad total del principio activo asociado al nanolipogel administrado a un individuo será menor que la cantidad del principio activo no asociado que debe administrarse para el mismo efecto deseado o pretendido.

35 **1. Formulaciones para administración parenteral**

En una realización preferida, los nanolipogeles se administran en una solución acuosa, por inyección parenteral. La formulación puede estar en forma de suspensión o emulsión. En general, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades efectivas de uno o más principios activos que incluyen opcionalmente diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir diluyentes, agua estéril, solución salina tamponada de diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; y opcionalmente, aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, TWEEN® 20, TWEEN® 80 también denominados polisorbato 20 u 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio) y conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de carga (p.ej., lactosa, manitol). Ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Las formulaciones se pueden liofilizar y redissolver/resuspender inmediatamente antes de su uso. La formulación puede esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones o calentando las composiciones.

2. Formulaciones para administración tópica y mucosa

55 Los nanolipogeles pueden aplicarse tópicamente. La administración tópica puede incluir la aplicación a los pulmones, mucosa nasal, oral (sublingual, bucal), vaginal o rectal. Estos métodos de administración pueden hacerse efectivos formulando la cubierta con elementos de transporte transdérmicos o mucosos. Para la administración transdérmica, tales elementos pueden incluir potenciadores químicos o potenciadores físicos tales como la electroporación o la administración mediante microagujas. Para la administración en la mucosa, la PEGilación de la cubierta externa o adición de quitosano u otros permeantes de la mucosa o elementos protectores de PH para la administración oral.

60 Las composiciones pueden administrarse a los pulmones mientras se inhalan y atraviesan el revestimiento epitelial pulmonar hacia el torrente sanguíneo cuando se administran en forma de aerosol o partículas secas por pulverización que tienen un diámetro aerodinámico de menos de aproximadamente 5 micrómetros.

65 Se puede usar una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos

terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la materia. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercializados son el nebulizador UltraVent® (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); el nebulizador Acom® II (Marquest Medical Products, Englewood, Colorado); el inhalador de dosis medida Ventolin® (Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); y el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons Corp., Bedford, Mass.). Nektar, Alkermes y Mannkind tienen preparaciones de insulina en polvo inhalables aprobadas o en ensayos clínicos donde la tecnología podría aplicarse a las formulaciones descritas en el presente documento.

Las formulaciones para la administración a la mucosa serán normalmente partículas de fármaco secadas por pulverización, que pueden incorporarse en un comprimido, gel, cápsula, suspensión o emulsión. Los excipientes farmacéuticos estándar están disponibles en cualquier formulador. Las formulaciones orales pueden estar en forma de chicle, tiras de gel, comprimidos, cápsulas o pastillas para chupar. Las formulaciones orales pueden incluir excipientes u otras modificaciones de la partícula que pueden conferir protección entérica o mejorar la administración a través del tracto gastrointestinal, incluidos el epitelio intestinal y la mucosa (ver Samstein et al. Biomaterials 29(6):703-8 (2008)).

También se pueden preparar formulaciones transdérmicas. Por lo general, serán pomadas, lociones, aerosoles o parches, todos los cuales se pueden preparar utilizando tecnología estándar. Las formulaciones transdérmicas pueden incluir potenciadores de la penetración. Los potenciadores químicos y los métodos físicos, incluidas la electroporación y las microagujas, pueden utilizarse junto con este método.

IV. Tratamientos

Los nanolipogeles cargados con uno o más principios activos, para administrar uno o más principios activos a las células, o al microambiente de una célula, son normalmente para uso en el tratamiento. Los usos incluyen normalmente poner en contacto el nanolipogel cargado con principio activo con una o más células. El contacto puede ocurrir *in vivo* o *in vitro*.

La administración de un fármaco u otra carga a las células o un sujeto que usa nanolipogeles puede compararse con un control, por ejemplo, la administración del fármaco u otra carga a las células o un sujeto que usa métodos de administración convencionales, tales como la administración de carga/fármaco libre, la administración usando nanopartículas de PLGA convencionales, o administración usando métodos liposomales convencionales como LIPOFECTAMINE®. Los nanolipogeles pueden usarse para administración de carga a las células objetivo con mayor eficacia en comparación con los métodos de administración convencionales. En algunas realizaciones, se requiere menos carga o fármaco cuando se administran usando nanolipogeles en comparación con los métodos de administración convencionales para lograr el mismo o mayor beneficio terapéutico.

En algunas realizaciones, la toxicidad es reducida o ausente en comparación con los métodos de administración convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los niveles de leucocitos, plaquetas, hemoglobina y hematocrito estaban dentro de los intervalos fisiológicos normales; no se observan toxicidades hepáticas o renales; el peso corporal y las concentraciones séricas de fosfatasa alcalina, alanina transferasa, bilirrubina total y nitrógeno ureico en sangre son normales; o combinaciones de los mismos después de la administración de nanolipogeles cargados al sujeto.

A. Métodos *in vivo*

Las composiciones divulgadas pueden usarse para administrar principios activos a las células *in vivo*. En algunas estrategias *in vivo*, las composiciones se administran a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una dosis suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas del trastorno que se está tratando o de otro modo para proporcionar un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. La dosificación precisa variará de acuerdo con varios factores, tales como variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad y el tratamiento que se realiza.

1. Administración de fármacos

Las partículas se pueden usar para administrar una cantidad efectiva de uno o más agentes terapéuticos, diagnósticos y/o profilácticos a un individuo que necesita dicho tratamiento. El médico que prescribe puede determinar fácilmente la cantidad de agente a administrar y depende de la edad y el peso del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar.

Las partículas son útiles en la administración de fármacos (como se usa en el presente documento "fármaco" incluye agentes terapéuticos, nutricionales, diagnósticos y profilácticos), ya sea inyectados por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, administrados al sistema nasal o pulmonar, inyectados en un medio tumoral, administrados a una superficie de la mucosa (vaginal, rectal, bucal, sublingual) o encapsulada para la administración oral. Las partículas pueden administrarse como un polvo seco, como una suspensión acuosa (en agua, solución salina, solución salina

tamponada, etc.), en un hidrogel, organogel, en cápsulas, comprimidos, grageas u otro excipiente farmacéutico estándar.

5 La realización preferida es un polvo seco rehidratado con el capsulante de interés en solución salina estéril u otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Como se describe en el presente documento, las composiciones pueden usarse como vehículos de administración para una serie de principios activos que incluyen moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas y otros agentes bioactivos. El agente o principios activos pueden encapsularse dentro, dispersarse dentro y/o asociarse con la superficie de la partícula de nanolipogel. En algunas realizaciones, el nanolipogel empaqueta dos, tres, cuatro o más principios activos diferentes para la administración simultánea a una célula.

2. Transfección

15 Las composiciones divulgadas pueden ser para la transfección celular de polinucleótidos. Como se analiza con más detalle a continuación, la transfección puede ocurrir *in vitro* o *in vivo*, y puede aplicarse en aplicaciones que incluyen terapia génica y tratamiento de enfermedades. Las composiciones pueden ser más eficientes, menos tóxicas o una combinación de las mismas en comparación con un control. En algunas realizaciones, el control son células tratadas con un reactivo de transfección alternativo tal como LIPOFECTAMINE 2000,

20 El polinucleótido particular administrado por el nanolipogel puede ser seleccionado por un experto en la materia dependiendo de la afección o enfermedad a tratar. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, un gen o ADNc de interés, un ácido nucleico funcional tal como un ARN inhibidor, un ARNt, un ARNr o un vector de expresión que codifica un gen o ADNc de interés, un ácido nucleico funcional un ARNt, o un ARNr. En algunas realizaciones, dos o más polinucleótidos se administran en combinación.

30 En algunas realizaciones, el polinucleótido codifica una proteína. Los ejemplos de proteínas incluyen, por ejemplo, (a) factores angiogénicos y otros que incluyen factores de crecimiento tales como factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, factor de crecimiento endotelial vascular, factores de crecimiento mitogénico endotelial, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante α y β , factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral- α , factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento similar a la insulina; (b) inhibidores del ciclo celular tales como quinasas dependientes de ciclina, timidina quinasa ("TK") y otros agentes útiles para interferir con la proliferación celular; (c) proteínas morfogénicas óseas ("BMP"), incluidas BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15 y BMP-16. Las BMP son normalmente proteínas diméricas que pueden proporzionarse como homodímeros, heterodímeros o combinaciones de los mismos, solos o junto con otras moléculas. Como alternativa, o además, se pueden proporcionar moléculas capaces de inducir un efecto aguas arriba o aguas abajo de una BMP. Dichas moléculas incluyen cualquiera de las proteínas "hedgehog", o el ADN que las codifica.

40 En algunas realizaciones, el polinucleótido no se integra en el genoma de la célula hospedadora (es decir, permanece extracromosómico). Dichas realizaciones pueden ser útiles para la expresión transitoria o regulada del polinucleótido, y reducir el riesgo de mutagénesis insercional. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los nanolipogelees se usan para administrar ARNm o vectores de expresión no integrantes que se expresan de forma transitoria en la célula hospedadora.

50 En algunas realizaciones, el polinucleótido se integra en el genoma de la célula hospedadora. Por ejemplo, la terapia génica es una técnica para corregir genes defectuosos responsables del desarrollo de la enfermedad. Los investigadores pueden usar una de varias estrategias para corregir genes defectuosos: (a) se puede insertar un gen normal en una ubicación inespecífica dentro del genoma para reemplazar un gen no funcional. Esta estrategia es la más común; (b) se puede intercambiar un gen anormal por un gen normal mediante recombinación homóloga; (c) se puede reparar un gen anormal mediante una mutación inversa selectiva, que devuelve el gen a su función normal; (d) se puede alterar la regulación (el grado en que se activa o desactiva un gen) de un gen particular.

55 La terapia génica puede incluir el uso de vectores virales, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, virus vaccinia, virus de la polio, virus del SIDA, virus trófico neuronal, Sindbis y otros virus de ARN, incluidos estos virus con la estructura del VIH. También son útiles las familias virales que comparten las propiedades de estos virus que los hacen adecuados para su uso como vectores. Normalmente, los vectores virales contienen genes tempranos no estructurales, genes tardíos estructurales, un transcrito de ARN polimerasa III, repeticiones terminales invertidas necesarias para la replicación y encapsidación, y promotores para controlar la transcripción y replicación del genoma viral. Cuando se diseñan como vectores, los virus normalmente eliminan uno o más de los primeros genes y se inserta un gen o casete de gen/promotor en el genoma viral en lugar del ADN viral eliminado.

65 El direccionamiento genético a través de la recombinación objetivo, como la recombinación homóloga (HR), es otra estrategia para la corrección génica. La corrección génica en un locus objetivo puede estar mediada por fragmentos de ADN del donante homólogos al gen objetivo (Hu et al., *Mol. Biotech.*, 29:197-210 (2005); Olsen, et al., *J. Gene*

Med., 7:1534-1544 (2005)). Un método de recombinación dirigida incluye el uso de oligonucleótidos formadores de triplex (TFO) que se unen como terceras cadenas a sitios de homopurina/homopirimidina en ADN dúplex de una manera específica de la secuencia. Los oligonucleótidos formadores de triplex pueden interactuar con ácidos nucleicos bicatenarios o monocatenarios.

5 Los métodos para la terapia génica dirigida utilizando oligonucleótidos formadores de triplex (TFO) y ácidos nucleicos peptídicos (PNA) se describen en la Solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 20070219122 y su uso para tratar enfermedades infecciosas como el VIH se describen en la Solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 2008050920. Las moléculas formadoras de triplex también pueden ser ácidos nucleicos peptídicos de fijación de cola (tcPNA), como los descritos en la Solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 2011/0262406. Se pueden formar estructuras triplex PNA:DNA:PNA altamente estables a partir de la invasión de una cadena de un ADN dúplex con dos cadenas de PNA. En este complejo, la porción de triple hélice PNA/DNA/PNA y la porción dúplex PNA/DNA producen desplazamiento de la triple hélice rica en pirimidina, creando una estructura alterada que se ha demostrado que provoca claramente la vía de reparación por escisión de nucleótidos y activa el sitio para la recombinación con el oligonucleótido donante. Dos cadenas de PNA también se pueden unir para formar una molécula de bis-PNA.

20 Las moléculas formadoras de triplex son útiles para inducir recombinación homóloga específica de sitio en células de mamífero cuando se usan en combinación con uno o más oligonucleótidos donantes que proporcionan la secuencia corregida. Los oligonucleótidos donantes pueden estar unidos a moléculas que forman triplex o pueden separarse de las moléculas que forman triplex. Los oligonucleótidos donantes pueden contener al menos una mutación, inserción o delección de nucleótidos en relación con el ADN dúplex objetivo.

25 Las moléculas formadoras de dúplex dobles, como un par de oligonucleótidos pseudocomplementarios, también pueden inducir la recombinación con un oligonucleótido donante en un sitio cromosómico. El uso de oligonucleótidos pseudocomplementarios en la terapia génica dirigida se describe en la Solicitud publicada de los Estados Unidos N.º 2011/0262406. Los oligonucleótidos pseudocomplementarios son oligonucleótidos complementarios que contienen una o más modificaciones de modo que no se reconocen o hibridan entre sí, por ejemplo debido a un impedimento estérico, pero cada uno puede reconocer e hibridarse con cadenas de ácido nucleico complementarias en el sitio objetivo. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pseudocomplementarios son ácidos nucleicos peptídicos pseudocomplementarios (pcPNAs). Los oligonucleótidos pseudocomplementarios pueden ser más eficientes y proporcionar una mayor flexibilidad del sitio objetivo respecto a los métodos de recombinación inducida, tales como oligonucleótidos de triple hélice y ácidos nucleicos bis-peptídicos que requieren una secuencia de polipurina en el ADN bicatenario objetivo.

35 **B. Métodos *in vitro***

Las composiciones divulgadas se pueden usar en un método para administrar principios activos a las células *in vitro*. Por ejemplo, los nanolipogees pueden usarse para la transfección *in vitro* de células. El método normalmente implica poner en contacto las células con nanolipogees que incluyen un polinucleótido en una cantidad efectiva para introducir el polinucleótido en el citoplasma de la célula. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra a las células en una cantidad efectiva para cambiar el genotipo o un fenotipo de la célula. Las células pueden ser células primarias aisladas de un sujeto o células de una línea celular establecida. Las células pueden ser de un tipo de célula homogénea, o pueden ser una mezcla heterogénea de diferentes tipos de células. Por ejemplo, los poliplexes se pueden introducir en el citoplasma de las células desde una línea celular heterogénea que posee células de diferentes tipos, como en un cultivo de células alimentadoras, o un cultivo mixto en varios estados de diferenciación. Las células pueden ser una línea celular transformada que se puede mantener indefinidamente en cultivo celular. Ejemplos de líneas celulares son las disponibles en el American Type Culture Collection, incluidas las líneas celulares tumorales.

50 Cualquier célula eucariota puede transfectarse para producir células que expresen un ácido nucleico específico, por ejemplo, un gen metabólico, que incluye células primarias, así como líneas celulares establecidas. Los tipos adecuados de células incluyen, pero no se limitan a, células indiferenciadas o parcialmente diferenciadas, que incluyen células madre, células totipotentes, células pluripotentes, células madre embrionarias, células de masa interna, células madre adultas, células de médula ósea, células de sangre del cordón umbilical y células derivadas de ectodermo, mesodermo o endodermo. Las células diferenciadas adecuadas incluyen células somáticas, células neuronales, músculo esquelético, músculo liso, células pancreáticas, células hepáticas y células cardíacas. En otra realización, pueden transfectarse en una célula ARNip, polinucleótidos antisentido (incluyendo ARNip o polinucleótidos antisentido) o ARN inhibidor usando las composiciones descritas en el presente documento.

60 Los métodos son particularmente útiles en el campo de la terapia personalizada, por ejemplo, para reparar un gen defectuoso, diferenciar células o reprogramar células. Por ejemplo, las células diana se aíslan primero de un donante utilizando métodos conocidos en la técnica, en contacto con el nanolipogel que incluye un polinucleótido que causa un cambio *in vitro* (*ex vivo*), y se administran a un paciente que lo necesite. Las fuentes o células incluyen células recogidas directamente del paciente o de un donante alográfico. En realizaciones preferidas, las células diana que se administrarán a un sujeto serán autólogas, p.ej., derivadas del sujeto, o singénicas. Las células

alogénicas también se pueden aislar de donantes genéticamente compatibles, no relacionados genéticamente (identificados a través de un registro nacional), o mediante el uso de células objetivo obtenidas o derivadas de un hermano o padre genéticamente relacionado.

- 5 Las células pueden seleccionarse mediante técnicas de selección positiva y/o negativa. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen a una proteína particular de la superficie celular pueden conjugarse con perlas magnéticas y utilizarse procedimientos inmunogénicos para recuperar el tipo de célula deseado. Puede ser deseable enriquecer las células diana antes de la transfección transitoria. Como se usa en el presente documento en el contexto de composiciones enriquecidas para una célula objetivo particular, “enriquecido” indica una proporción de un elemento deseable (por ejemplo, la célula objetivo) que es mayor que la encontrada en la fuente natural de las células. Una composición de células puede enriquecerse respecto a una fuente natural de las células en al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y más preferiblemente 10, 100, 200 o 1000 órdenes de magnitud. Una vez que las células objetivo se han aislado, se pueden propagar creciendo en un medio adecuado de acuerdo con los métodos establecidos conocidos en la técnica. Las líneas celulares establecidas también pueden ser útiles para los métodos. Las células pueden almacenarse congeladas antes de la transfección, si es necesario.

20 A continuación, las células se ponen en contacto con la composición divulgada *in vitro* para reparar, desdiferenciar, volver a diferenciar y/o reprogramar la célula. Las células pueden controlarse y el tipo de célula deseado puede seleccionarse para administración terapéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos divulgados se usan para crear células pluripotentes o multipotentes alogénicas (es decir, células madre) a partir de células diferenciadas, o para cambiar el fenotipo de células inmunitarias.

25 Después de la reparación, desdiferenciación y/o rediferenciación y/o reprogramación, las células se administran a un paciente que lo necesite. En las realizaciones más preferidas, las células se aíslan y se administran de nuevo al mismo paciente. En realizaciones alternativas, las células se aíslan de un paciente y se administran a un segundo paciente. El método también se puede utilizar para producir reservas congeladas de células alteradas que se pueden almacenar a largo plazo, para su uso posterior. En una realización, los fibroblastos, los queratinocitos o las células madre hematopoyéticas se aíslan de un paciente y se reparan, se diferencian o se reprograman *in vitro* para proporcionar células terapéuticas para el paciente.

30

C. Enfermedades a tratar

35 Las composiciones que incluyen vehículos de administración de nanolipogel se pueden usar para tratar varias enfermedades y afecciones, por ejemplo, cáncer y enfermedades infecciosas. Las composiciones pueden administrarse al sujeto terapéutica o profilácticamente. Los ejemplos de estrategias terapéuticas y profilácticas se analizan con más detalle a continuación y en los Ejemplos.

40 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los péptidos que penetran en las células, también conocidos como péptidos permeables a las células, dominios de transducción de proteínas (PTD), secuencias de translocación de membrana (MTS) y péptidos troyanos (por ejemplo, un péptido que penetra en las células que responde al estímulo) es un péptido conjugado con un dendrímero en una formulación de nanolipogel. Los péptidos que penetran en las células incluyen, pero no se limitan a, polímeros derivados de virus o que imitan tales como TAT, péptido de fusión de influenza, fragmento de glicoproteína del virus de la rabia (RVG), neuropilina, penetratina y poliargininas. Anaspec tiene CPP disponibles comercialmente.

45

El nanolipogel se puede usar para administrar principios activos a las células, incluyendo, pero no limitadas a, las células difíciles de penetrar, las células infectadas por VIH, los linfomas de linfocitos T y los linfocitos B.

50 En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye un agonista del receptor de muerte (como ligando de Fas/CD95 y TRAIL/Apo2L) y receptores de muerte (como Fas/CD95, TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5) que está implicado en la neutralización inmunomediada de linfocitos activados o autorreactivos, células infectadas por virus y células tumorales. La desregulación de las vías de señalización apoptótica dependiente del receptor de muerte se ha implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, inmunodeficiencia y cáncer. Además, el ligando de muerte TRAIL ha ganado considerable interés como un posible agente anticanceroso, dada su capacidad para inducir la apoptosis de las células tumorales sin afectar a la mayoría de los tipos de células no transformadas. La proteína inhibidora de FLICE (FLIP) bloquea potentemente la muerte celular mediada por TRAIL al interferir con la activación de caspasa-8. La regulación farmacológica a la baja de FLIP podría servir como un medio terapéutico para sensibilizar a las células tumorales a la inducción de apoptosis por TRAIL. En consecuencia, los ligandos o receptores de muerte pueden incorporarse sobre o dentro del nanolipogel como el resto de direccionamiento y/o como el principio activo para mejorar la administración específica de células y para sensibilizar células objetivo, tales como células cancerosas o células transformadas viralmente, a la apoptosis.

60

65 En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye un resto que se dirige específicamente a una sirtuina. Las proteínas sirtuina o Sir2 son una clase de proteínas que poseen actividad histona desacetilasa o mono-ribosiltransferasa. Las sirtuinas regulan importantes vías biológicas en bacterias, arqueas y eucariotas, y se han implicado en su influencia en el envejecimiento y regulación de la transcripción, la apoptosis y la resistencia al estrés, así como la eficiencia

energética y el estado de alerta durante situaciones de bajas calorías. En consecuencia, las proteínas sirtuina o Sir2 pueden ser dirigidas como parte de una estrategia profiláctica o terapéutica antienvjecimiento.

5 En algunas realizaciones, el (los) agente (s) activo (s) incluyen un inhibidor de la histona desacetilasa (HDACi). Los HDACi son compuestos químicos que interfieren con la función de las enzimas HDAC. Inhiben la actividad de la enzima HDAC y, por lo tanto, inclinan el equilibrio a favor de las histonas acetiladas. La HDACi también puede afectar a la actividad de muchas proteínas que no son histonas, ya que también pueden ser objetivo de la acetilación/desacetilación de la lisina, lo que lleva a un episodio incrementado de acetilación de muchos grupos de genes, lo que aumenta la actividad de transcripción y, posteriormente, la regulación positiva de genes específicos. En algunas realizaciones, el principio activo incluye un agente quimioterapéutico. La administración conjunta de un HDACi y un fármaco quimioterapéutico puede ser particularmente eficaz para tratar cánceres, incluidos los cánceres resistentes a múltiples fármacos, como el cáncer de páncreas y el melanoma.

15 En algunas realizaciones, el nanolipogel es parte de una estrategia de vacuna. Por ejemplo, el nanolipogel puede usarse para administrar un antígeno, un inmunoestimulante, un adyuvante o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye un resto objetivo que dirige el vehículo de administración a células inmunitarias específicas, por ejemplo, células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas. En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye uno o más restos dirigidos a las células presentadoras de antígeno que se muestran en la cubierta externa, y los ligandos TLR dentro o fuera del nanolipogel, solos o en combinación con un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno conocido, por ejemplo, un antígeno derivado de una bacteria, un virus, un hongo, un parásito u otro microbio, o antígenos tumorales o antígenos ambientales.

25 En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye elementos sensibles al pH de modo que los contenidos del nanolipogel se liberen al encontrar un pH bajo. Esta estrategia puede emplearse para aumentar la administración del contenido de nanolipogel a las células tumorales o microambientes o células cardíacas en condiciones hipóxicas. En algunas realizaciones, los nanolipogeles se usan en terapia fotodinámica. Por ejemplo, el nanolipogel sensible al pH puede liberar un agente de terapia fotodinámica como la hipercirina, el área de tratamiento, por ejemplo, las células tumorales o un microambiente tumoral.

30 En algunas realizaciones, el agente o principios activos incluyen nucleasas efectoras similares a un activador de la transcripción. Las TALEN son enzimas de restricción artificiales generadas fusionando el dominio de unión al ADN efector de TAL con un dominio de escisión del ADN. Las TALEN pueden emplearse para una escisión de ADN eficiente, programable y específica y representan herramientas poderosas para la edición del genoma *in situ*. Los factores de transcripción sintéticos que usan construcciones de dominio TALE también se pueden usar para la regulación génica emparejando el dominio de unión a ADN TALE con un dominio de activación endógeno que afecta a la expresión en sitios específicos en genomas complejos. Los efectores similares a los activadores de la transcripción (TALE) pueden diseñarse rápidamente para unirse prácticamente a cualquier secuencia de ADN. En consecuencia, los TALEN pueden usarse en métodos de terapia génica, por ejemplo, para editar genes asociados con el VIH, como CCR5, o para tratar mutaciones monogénicas en enfermedades genéticas como la fibrosis quística.

45 En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye un resto dirigido a la molécula de patrón molecular asociado a patógeno (PAMP). Los PAMP son pequeños motivos moleculares asociados con grupos de patógenos, que son reconocidos por las células del sistema inmunitario innato. Son reconocidos por los receptores de tipo Toll (TLR) y otros receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en plantas y animales. Activan respuestas inmunitarias innatas, protegiendo al hospedador de la infección, identificando algunas moléculas no propias conservadas. Por ejemplo, el lipopolisacárido bacteriano (LPS), una endotoxina que se encuentra en la membrana celular bacteriana de una bacteria, se considera el PAMP prototípico. El LPS es específicamente reconocido por TLR 4, un receptor de reconocimiento del sistema inmunitario innato. Otros PAMP incluyen, pero no se limitan a, flagelina bacteriana (reconocida por TLR 5), ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, peptidoglicano y variantes de ácido nucleico normalmente asociadas con virus, como el ARN de doble cadena (ARNdc), reconocido por TLR 3 o motivos CpG no metilados, reconocidos por TLR 9. En consecuencia, se pueden usar uno o más PAMP para aumentar la respuesta inmunitaria contra una enfermedad infecciosa.

55 En algunas realizaciones, el nanolipogel incluye una molécula de patrón molecular asociada al daño (DAMP). Las DAMP incluyen moléculas intracelulares liberadas por células activadas o necróticas y moléculas de la matriz extracelular reguladas al alza tras una lesión o degradadas después del daño tisular. Las DAMP son señales de peligro que dan la alerta de señal inmunitaria hacia el daño tisular tras la infección y el daño tisular, aunque también se han implicado en una inflamación excesiva que incluye artritis reumatoide, cáncer y aterosclerosis (Piccinini y Midwood, *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, ID del artículo 672395, 21 páginas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, las DAMP pueden usarse como parte de una estrategia de nanolipogel para inducir una respuesta inmunitaria en la que las DAMP imitan una célula necrótica. Los ejemplos de DAMP incluyen, pero no se limitan a, F-actina, HMGB1 (proteína de caja de grupo de alta movilidad-1), S100A8/S100A9, proteínas de choque térmico, ácido úrico y ADN. En algunas realizaciones, las DAMP se incorporan en una estrategia de vacuna, por ejemplo, una estrategia de vacuna contra el cáncer. Por ejemplo, las DAMP pueden administrarse a las células inmunitarias usando un nanolipogel decorado con un ligando dirigido a la célula presentadora de antígeno. En algunas

realizaciones, la estrategia de vacuna contra el cáncer también incluye la administración de uno o más antígenos asociados a tumores.

D. Ejemplos de estrategias de tratamiento de enfermedades

5

1. Inmunoterapia y tratamiento del cáncer

Se postula que un mecanismo detrás de cómo los melanomas y otros cánceres evaden la respuesta antitumoral es la incapacidad del sistema inmunitario innato para reconocer el tumor como “no propio”. Esto puede ocurrir debido a la secreción de varios factores inmunosupresores por las células tumorales, incluido el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una citocina pleiotrópica que disminuye el número y la función de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y la función de los linfocitos T citotóxicos (CTL) al tiempo que aumentan el número de linfocitos T reguladores (Tregs). La actividad de TGF- β se ha evaluado ampliamente en varios sistemas de enfermedades animales, incluidos los modelos de tumores murinos, y se sospecha que su secreción frustra la terapia con altas dosis de interleucina-2 (IL-2), que se supone que mejora la actividad de NK y CTL contra melanomas y cánceres de células renales, pero carece de eficacia en la mayoría de los pacientes. Esto ha llevado a los grupos a evaluar estrategias para contrarrestar los factores inmunosupresores secretados por los tumores, incluido el TGF- β . Aunque la fuente exacta de TGF- β intratumoral no se ha establecido bien, la citocina se ha encontrado en niveles altos en una gran cantidad de tumores diferentes, incluidos los melanomas. Se cree que el TGF- β es fundamental para el crecimiento y la diferenciación de las células tumorales, así como para mantener un entorno inmunosupresor para proteger un tumor establecido de la respuesta inmunitaria del hospedador, lo que lo convierte en un objetivo ideal para las terapias contra el cáncer. En particular, su efecto supresor sobre el número de linfocitos NK presentes en los lechos tumorales puede ser crucial para la tolerancia inmunitaria, ya que estas células juegan un papel importante en la respuesta antitumoral.

25

Los ejemplos demuestran la eficacia de la liberación simultánea y sostenida de IL-2 y SB contra tumores. Dadas las propiedades fisicoquímicas muy diferentes de IL-2, una proteína soluble de 17 kDa, y SB, un pequeño fármaco hidrófobo ($\text{Log } P=4,33$), la coencapsulación para la liberación sostenida de ambos agentes presentó un desafío para las tecnologías convencionales de partículas. Por ejemplo, los liposomas se modifican fácilmente para la encapsulación de pequeñas moléculas hidrófilas e incluso proteínas, pero la estabilidad de estas formulaciones y los perfiles de liberación de los agentes encapsulados no se controlan fácilmente. Las partículas sólidas biodegradables, por otro lado, como las fabricadas a partir de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), son altamente estables y tienen características de liberación controlables, pero presentan complicaciones para la encapsulación fácil y la liberación controlada de citocinas terapéuticas o para la administración en combinación.

30

El melanoma metastásico es altamente agresivo, siendo la supervivencia media de los pacientes no tratados menos de 12 meses. La ineficacia de las intervenciones quirúrgicas, la radiación y las quimioterapias citotóxicas ha resultado en la inmunoterapia como modalidad de tratamiento primario. Aproximadamente el 5 % de los pacientes con melanoma metastásico logran remisiones completas duraderas cuando se tratan con dosis altas de IL-2, presumiblemente por inducción o expansión de la activación de respuestas de linfocitos T específicas de melanoma. Sin embargo, debido a que la alta toxicidad relacionada con la dosis de IL-2 obstaculiza sus beneficios terapéuticos, las formulaciones de nueva generación tienen como objetivo reducir la dosis administrada al aumentar la semivida de la citocina en circulación. Algunos ejemplos incluyen proteínas de fusión (IL-2/Ig), IL-2 pegilada, complejos IL-2/anti-IL-2, formulaciones liposomales y vectores virales y plasmídicos. La administración combinada de nanolipogel de inhibidor de TGF- β e IL-2 mejora la inmunoterapia tumoral. La liberación sostenida de dos agentes químicos diversos a partir de nanolipogeles produce un efecto antitumoral impresionante. El microambiente tumoral frustra la inmunoterapia convencional a través de múltiples mecanismos inmunológicos. Se cree que varios de estos mecanismos incluyen la secreción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que frustra las respuestas inmunitarias tumorales locales. Por lo tanto, incluso una dosis alta de interleucina-2 (IL-2), un tratamiento convencional de citocina aprobado por la FDA para el melanoma metastásico, solo induce respuestas limitadas.

40

Para eludir la naturaleza inmunoinhibitoria del microambiente tumoral, se necesita un vehículo para liberar al microambiente tumoral de manera controlada un inhibidor del TGF- β junto con IL-2. Un inhibidor bien conocido del TGF- β es el clorhidrato de 2-(5-benzo[1,3]dioxol-5-il-2-*terc*-butil-3H-imidazol-4-il)-6-metilpiridina (conocido como SB-505124 y denominado en el presente documento SB). Sin embargo, dadas las propiedades fisicoquímicas muy diferentes de IL-2, una proteína soluble de 17 kDa, y SB, un pequeño fármaco hidrófobo ($\text{Log } P = 4.33$), la coencapsulación para la liberación sostenida de ambos agentes presentó un desafío para las tecnologías convencionales de partículas. La plataforma de nanolipogel combina características tanto de liposomas como de partículas a base de polímeros para la encapsulación y la administración sostenida de proteínas terapéuticas y fármacos hidrófobos de molécula pequeña.

55

La administración sostenida de IL-2 y SB desde este sistema induce potentes respuestas inmunitarias antitumorales en un modelo de melanoma de ratón B16/B6 después de la administración intratumoral o sistémica. Los nanolipogeles que liberan inhibidor del TGF- β e IL-2 retrasaron significativamente el crecimiento tumoral, aumentaron la supervivencia de ratones portadores de tumores y aumentaron los linfocitos citolíticos naturales (NK) intratumorales. Además, la inducción de la remisión con esta terapia combinada estuvo mediada por la activación de

60

ambos tipos de respuesta inmunitaria, la innata y la adaptativa, desempeñando la respuesta innata un papel crítico en la mediación de la actividad antitumoral *in vivo*. La formulación ofrece una ventaja no solo al aumentar la vida media de las citocinas en circulación, sino también al coadministrar de manera sostenida SB, un potente inhibidor pleiotrópico que suprime la capacidad del tumor para frustrar una respuesta inmunitaria.

5 Las terapias combinadas que estimulan las respuestas inmunitarias a la vez que superan el entorno inhibitor del tumor son modalidades atractivas para la inmunoterapia contra el cáncer. La plataforma de nanolipogel que se ha demostrado que es efectiva en la terapia de combinación en los Ejemplos siguientes, a su vez, proporciona una
10 plataforma para la terapia en varias enfermedades en las que es deseable utilizar simultáneamente combinaciones de fármacos en un régimen de tratamiento. Dichas terapias combinadas, y las enfermedades en las que son útiles, son bien conocidas en la técnica.

15 Los ejemplos de terapias contra el cáncer se resumen en la Tabla 1 a continuación. La tabla presenta una aberración patológica que es abordada por la terapia; las células objetivo de la terapia; una, dos o tres moléculas terapéuticas que pueden ser administradas por los nanolipogeles solas o en cualquier combinación de las mismas; se puede usar un objetivo deseado o un grupo de direccionamiento para direccionar los nanoliposomas; el mecanismo de administración preferido; y efectos previstos de la terapia.

Tabla 1: Ejemplos de terapias y estrategias contra el cáncer

| Enfermedad | Aberración patológica | Célula(s) objetivo | Molécula administrada (DM) 1: | Molécula administrada 2: | DM3: | Estrategia de direccionamiento | Mecanismo de administración | Efecto |
|--|--|---------------------------------|---|-------------------------------------|------------|---|---|---|
| Cáncer resistente a múltiples fármacos (MDR) | la quimioterapia mata a las células que se dividen rápidamente fármaco que evade la senescencia del cáncer | células cancerosas | inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) | fármaco de quimioterapia | | dependiente del cáncer EPR, foliato, TAA, etc. | preferiblemente HDACi se administra primero | HDACi inicia la transcripción, resensibiliza las células a quimioterapia |
| Cáncer MDR | Treg inducidos (iTreg) mejoran la inmunosupresión del cáncer | iTreg | ARNip contra FoxP3 | HDACi para modificar la epigenética | | Los marcadores de superficie iTreg no son nTreg | | |
| Cáncer MDR | Los Tregs IL-10 tienen la misma función supresora que los iTreg FoxP3 en el ratón | Treg IL-10 | poco claro. IL-2 juega un papel ... | | | | | |
| Cáncer | las células cancerosas crean invisibilidad a las células inmunitarias | células tumorales | pHLIP-calreticulina | | ATP, HMGB1 | sensible al pH | se podrían utilizar otras DAMP | las células tumorales imitan la muerte celular inmunogénica, crean una respuesta inflamatoria |
| Cáncer | enfermedad promotora de macrófagos asociados a tumores (TAM) | TAM | | | | | | |
| Cáncer de páncreas irresecable | plásmido BC-819 | | | | | | | |
| Cáncer de páncreas MDR no resecable | dificultad en la administración de fármacos, resistencia a la quimioterapia | Células cancerosas pancreáticas | Inhibidor de HDAC (SAHA, TSA, etc.) | fármaco de quimioterapia | | anticuerpo para antígeno asociado a tumor (TAA) | | HDACi inicia la transcripción, resensibiliza las células a quimioterapia |

2. Enfermedades infecciosas

Los ejemplos no limitantes de enfermedades adicionales que pueden tratarse usando las composiciones divulgadas en el presente documento incluyen enfermedades infecciosas, virales o microbianas, en las cuales una combinación deseable de régimen antivírico o antibiótico, respectivamente, es la estrategia deseable. Por ejemplo, una formulación anti-VIH podría incluir activadores para iniciar la replicación del VIH, inhibidores que previenen la infección por VIH de nuevas células y una mezcla de inductores de muerte que se activan exclusivamente dentro de la célula infectada sin que los demás sufran daños. La cubierta lipídica externa se puede fabricar con un anticuerpo que se une específicamente a una molécula expresada en todos los linfocitos T humanos. Esto sirve como el vehículo de direccionamiento que protege los componentes encerrados y se fusiona con los linfocitos T objetivo. El núcleo de nanolipogel está fabricado con un polímero seguro aprobado por la FDA que encapsula un 'dendrímero'.

Este núcleo interno de dendrímero forma un complejo con 1) *Un inhibidor de la HDAC* (HDACi) que activa el VIH. Este agente inhibe las enzimas conocidas como histona desacetilasas (HDAC) que eliminan constantemente los grupos acetilo en las histonas, permitiendo la unión continua de las histonas al ADN cromosómico, lo que ayuda a mantener el VIH latente; 2) *Un plásmido que codifica inhibidores de ARN llamado ARN interferente pequeño* (ARNip) que se une exclusivamente al ARN viral y lo destruye por una vía celular llamada interferencia de ARN. Los ARNip pueden diseñarse para dirigirse solo al objetivo de ARNm previsto con efectos secundarios mínimos, lo que proporciona una inmensa ventaja. Estos ARNip pueden expresarse en todos los linfocitos T para evitar la propagación viral de la célula infectada, así como la infección productiva en las células no infectadas; y 3) Otro plásmido que codifica ARNip controlados por un promotor que se activa exclusivamente por las proteínas del VIH tat y rev y, por lo tanto, se expresa solo en células infectadas. Estos ARNip están diseñados para unir y destruir ARN de proteínas que promueven la supervivencia celular. Tras la unión, todo el sistema es internalizado por la maquinaria celular sin alterar la fisiología celular o la homeostasis, la partícula más externa se descompone para liberar el núcleo interno complejo de fármaco/gen, que se degrada aún más liberando los componentes. Por lo tanto, el sistema está doblemente regulado para la unión solo a los linfocitos T, los reservorios para el VIH latente y la destrucción selectiva de los reservorios de linfocitos T infectados.

Los ejemplos de terapias y estrategias a modo de ejemplo para tratar el VIH y otras enfermedades infecciosas se resumen en la Tabla 2 a continuación. La tabla presenta una aberración patológica que es abordada por la terapia; las células objetivo de la terapia; una, dos o tres moléculas terapéuticas que pueden ser administradas por los nanolipogeles solas o en cualquier combinación de las mismas; se puede usar un objetivo deseado o un grupo de direccionamiento para direccionar los nanoliposomas; el mecanismo de administración preferido; y efectos previstos de la terapia.

Tabla 2: Ejemplos de terapias y estrategias contra el VIH

| Enfermedad | Aberración patológica | Célula(s) objetivo | Molécula administrada (DM) 1: | Molécula administrada 2: | DM3: | Estrategia de direccionamiento | Mecanismo de administración | Efecto |
|-----------------------|---|---|--|---|-----------------|--------------------------------------|---|--|
| VIH | los linfocitos T infectados de forma latente evaden el TARGA | CD4+ infectado latente | Inhibidor de HDAC (SAHA, TSA, etc.) | ARNip contra proteínas específicas del VIH necesarias para la propagación | | anti-CD7-palmitato | preferiblemente se libera primero HDAC | las proteínas expresadas son tóxicas, las células latentes mueren |
| VIH | Los Tregs atenúan la activación inmunitaria del VIH, suprimen la respuesta inmunitaria al VIH + otros patógenos | FoxP3 + Treg, quizás específicos de Ag | ARNip dirigido a FoxP3 | | | anti-CD4 | | desactiva Treg permisivos |
| VIH | Los fármacos TARGA se dirigen a todas partes | linfocitos T CD4+ infectados | fármaco TARGA 1 | fármaco TARGA 2 | fármaco TARGA 3 | anti-CD4 | | agrupa fármacos TARGA para aumentar la eficiencia y disminuir los efectos secundarios |
| VIH | CCR5 permite la entrada del VIH | Linfocitos T CD4+ | Nucleasa de dedo de zinc (ZFN) o TALEN contra CCR5 | | | anti-CD4 | estrategia profiláctica | protege contra la entrada celular del VIH |
| VIH | Los epitopos de VIH restringidos por MHC no generan una respuesta inmunitaria suficiente | APC (DC, macrófagos) | ZFN o TALEN para cambiar la secuencia de MHC | | | pasivo o ligando de TLR, anti-DEC205 | | modula las interacciones TCR/MHC-epitopo del VIH para iniciar una respuesta inm. robusta |
| VIH | Los epitopos de VIH restringidos por MHC no generan una respuesta inmunitaria suficiente | células que interactuarán con los linfocitos T, incluso las células epiteliales | moléculas óptimas de MHC-epitopo de VIH | | | | Inserción sensible al pH de MHC/epitopos para presentación de TCR | produce muchas APC; presenta epitopos de VIH de manera que se propaga la respuesta inmunitaria |
| Virus de Epstein Barr | Los linfocitos B infectados con EBV, el virus se replica | linfocitos B infectados con EBV | ARNip contra objetivos de EBV | | | anti-B220, otros | Secuencia de ARNip de Ayman | previene la replicación del virus - enfermedad de purga |

(continuación)

| Enfermedad | Aberración patológica | Célula(s) objetivo | Molécula administrada (DM) 1: | Molécula administrada 2: | DM3: | Estrategia de direccionamiento | Mecanismo de administración | Efecto |
|------------|-------------------------------------|------------------------|---|---|------|--------------------------------|-----------------------------|--|
| Malaria | el parásito infecta los eritrocitos | eritrocitos infectados | ADN plasmídico | más ADN plasmídico exceso de dendrímero para ayudar a romper el endosoma | | | Plásmidos Choukri Mamoun | transforma el parásito, identifica eritrocitos infectados resistentes a los fármacos |
| Leishmania | el parásito vive en los macrófagos | macrófagos infectados | miríada de fármacos de molécula pequeña | | | manosa, fragmento Fc, etc. | | expulsa el parásito del endolisosoma, lo destruye |

3. Otras indicaciones

Otro ejemplo no limitante es la enfermedad cardiovascular en la que se usan terapias combinadas bien conocidas en la técnica para reducir simultáneamente tanto la presión arterial como los niveles de colesterol. Es notable en una serie de tales enfermedades que modular la biodistribución también ofrecería ventajas en la estrategia de tratamiento y, como demuestran algunos de los ejemplos en esta invención, el uso de nanolipogeles ofrece una promesa con respecto al control de la biodistribución.

El éxito de las terapias combinadas es una plataforma de administración segura y flexible que libera varias moléculas efectoras con diferentes propiedades fisicoquímicas a los lechos tumorales de manera sostenida, como el sistema de administración de nanolipogel desarrollado en este trabajo. Trabajos recientes han demostrado que la combinación de otro inhibidor del receptor I del TGF- β (LY364947) y el agente quimioterapéutico citotóxico, doxorubicina, fue eficaz en una formulación particulada contra los carcinomas pancreáticos y gástricos. Las citocinas, incluida la IL-2, representan una red compleja de proteínas solubles críticas para la función celular inmunológica y efectora. De manera similar, los fármacos hidrófobos de molécula pequeña, como los antagonistas de TGF- β , representan una clase de inmunomoduladores que pueden superar las barreras que los tumores presentan para escapar de la respuesta inmunitaria. La administración sostenida de estos agentes en combinación a lechos tumorales puede inducir respuestas inmunitarias terapéuticas, al tiempo que reduce la naturaleza inmunorresistente del microambiente tumoral.

El modelo de melanoma B16 se utilizó para validar que las dificultades para garantizar la administración simultánea y sinérgica tanto de proteínas lábiles como de pequeñas moléculas hidrófobas pueden abordarse mediante la ingeniería racional de un sistema de administración a nanoescala fabricado a partir de componentes inertes y biodegradables con un historial de uso, individualmente, en diferentes aplicaciones de la administración de fármacos. Los ejemplos ilustran que la activación del sistema inmunitario innato es un mecanismo inmunológico crítico subyacente a los efectos sinérgicos de administrar simultáneamente IL-2 y SB, lo que tiene como resultado un crecimiento tumoral retardado y una mayor supervivencia de los ratones portadores de tumores. La administración de SB en combinación con IL-2 estimuló el sistema inmunitario innato, aumentando en gran medida el número de linfocitos NK en tumores en ratones que recibieron esta combinación. La ausencia de eficacia terapéutica después del agotamiento de linfocitos NK demostró que la estimulación de sistema inmunitario innato por nanopartículas que liberan ambos agentes fue crucial para lograr una mejora en la supervivencia en este modelo. Las partículas que liberan SB, IL-2 solo o la combinación también estimulan el sistema inmunitario adaptativo, aumentando las relaciones linfocitos CD8⁺ activados: Treg. Estos resultados muestran que la terapia combinada puede estimular ambos componentes del sistema inmunitario simultáneamente.

Los nanovehículos diseñados para liberar citocinas solubles y moléculas de fármacos hidrófobos de manera sostenida, incluso sin apuntar al tumor, se pueden usar para administrar simultáneamente una combinación de inmunomoduladores clave para disminuir el entorno inmunosupresor local y mejorar las respuestas antitumorales. La combinación de IL-2 y un antagonista de TGF- β en el sitio del tumor condujo a un retraso tumoral significativo y, en casos seleccionados, remisiones macroscópicas en el modelo de melanoma murino B16/B6. Es notable que los tumores agresivos como el melanoma desarrollen inherentemente vasculatura permeable con poros de 100 a 800 nm debido a la rápida formación de vasos para sostener un tumor de rápido crecimiento. Este defecto en la vasculatura y el drenaje linfático deficiente da como resultado una mayor permeabilidad y retención de nanopartículas dentro del lecho tumoral. Esto a menudo se llama permeación y retención mejoradas (EPR) y es una forma de 'direccionamiento pasivo'. La base para una mayor acumulación de nanopartículas cargadas de fármacos en los tumores respecto a los tejidos normales es que, a diferencia de los lechos tumorales irrigados por la vasculatura permeable, los tejidos normales contienen capilares con uniones estrechas que son menos permeables a las partículas de tamaño nanométrico. Por lo tanto, el direccionamiento pasivo puede dar lugar a un aumento de varias veces en las concentraciones de partículas en tumores sólidos en comparación con la administración libre de anticuerpos u otros fármacos y puede explicar el aumento de la supervivencia y el tratamiento efectivo de la metástasis observado después de la inyección intravenosa.

Este es un ejemplo de cómo se pueden usar los nanolipogeles con ventaja con respecto a la biodistribución. Otras estrategias para aumentar aún más este índice de supervivencia incluyen aumentar la frecuencia de las inyecciones, la dosificación por inyección o la inclusión de ligandos de retención tumoral en la superficie de la nanopartícula para mejorar la administración selectiva de agentes y la retención en el microambiente tumoral. La actividad de los linfocitos infiltrantes de tumores y los linfocitos NK puede potenciarse mediante la administración de citocinas adicionales como IL-15, que pertenece a la familia de citocinas IL-2 y que puede actuar mejorando la supervivencia de las células activadas por IL-2.

La presente invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de nanolipogees para la administración de moléculas antitumorales

Materiales y Metodos

Síntesis de nanolipogel. Las partículas de “nanolipogel” (“nLG”) se fabricaron a partir de un polímero degradable (Figura 1B). Los liposomas se usaron como moldes a nanoescala para la formación de hidrogel foto iniciado. Para lograr la liberación sostenida del fármaco hidrófobo junto con proteínas encapsuladas, se incorporaron β -ciclodextrinas (CD) conjugadas con metacrilato en el interior de los liposomas. Las β -ciclodextrinas tienen una larga historia como agentes de solubilización para compuestos hidrófobos y son excipientes clave en diversas formulaciones farmacéuticas. Este procedimiento de formulación permitió la coencapsulación de ambas proteínas, así como de pequeños fármacos hidrófobos dentro del interior de la bicapa lipídica (Figura 1A-1B).

Las CD conjugadas se crearon por reacción de CD succiniladas con grupos de metacrilato fotosensibles a través de grupos éster hidrolizables. (Figura 1A). La formación de complejos de SB o rodamina (para imágenes) con CD funcionalizada se verificó mediante resonancia magnética nuclear de protones (RMN de ^1H) en un espectrómetro Bruker de 500 MHz. Todas las muestras se disolvieron en 1-10 mg/ml en D_2O para la caracterización con el disolvente como referencia.

El diacrilato PLA-PEG-PLA se sintetizó en dos etapas de acuerdo con Sawhney y col. *Macromole* 26, 581-587 (1993). Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma a menos que se indique lo contrario y eran de calidad ACS o superior. Se cargaron α,ω -dihidroxipoli(óxido de etileno) con un peso molecular de 4000 g/mol, 3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona (*dl*-lactida), y 2-etilhexanoato de estaño (II) (octoato estannoso) en un matraz de fondo redondo bajo nitrógeno en una relación molar 5:1: 0,0075 y la reacción se agitó al vacío a 200 °C durante 4 horas, seguido de agitación a 160 °C durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el copolímero resultante se disolvió en diclorometano y se precipitó en éter anhidro. Este intermedio se disolvió en diclorometano (10 g/ml) y se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Por 10 g de intermedio de polímero, se añadieron 440 μl de trietilamina y 530 μl de cloruro de acrililo bajo nitrógeno y la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 0 °C y 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y el polímero resultante se precipitó en éter dietílico. El polímero final se redisolvió en diclorometano, se volvió a precipitar en hexanos y se caracterizó por FTIR y RMN.

El complejo de rodamina y SB505124 con ciclodextrinas se examinó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (RMN de ^1H) espectroscopía en un espectrómetro Bruker de 500 MHz.

Formulación de nanolipogel. Todos los lípidos se obtuvieron de Avanti Polar Lipids y se usaron sin preparación adicional. La fosfatidilcolina (PC), el 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(poli(etilenglicol)-2000)] (DSPE-PEG) y el colesterol se mezclaron en cloroformo en una relación molar 3:1:1 y los liposomas se formularon utilizando una técnica de carga remota de Peer et al. *Science* 319, 627-630 (2008). Los liposomas fluorescentes marcados con lípidos se formularon mediante la incorporación de 10 % de 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli(etilenglicol)2000-N'-carboxifluoresceína] (DSPE-PEG-Fluoresceína). Brevemente, los lípidos disueltos se mezclaron en un vial de centelleo de vidrio, seguido de la eliminación completa del disolvente con una corriente de nitrógeno dirigida. Esto formó una película delgada de lípidos en las superficies internas de vidrio, que se rehidrató mediante la adición de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Los ciclos de agitación vorticial de treinta segundos seguidos de 5 minutos de inactividad a temperatura ambiente se repitieron diez veces y los liposomas multilamelares resultantes se extruyeron 10 veces a través de una membrana de policarbonato de 5 μm (Whatman), 10 veces a través de una membrana de 1 μm y finalmente 11 veces mediante una extrusora LIPEX (Northern Lipids, Inc.) de 100 nm. Los liposomas unilamelares resultantes se congelaron y liofilizaron.

Los liposomas liofilizados se reconstituyeron con una solución que contenía 5 % (p/v) de polímero (Figura 1B) y 2,5 mg/ml de Ciba Irgacure 2959 como fotoiniciador y ningún otro aditivo (nLG-Vacío), 9 mg de SB solubilizado en f-CD/100 mg nLG (nLG-SB; SB505124, Sigma), 1 μg de IL-2/100 mg de lípidos (LG-IL-2; Aldesleukin Proleukin, Novartis), o ambos SB e IL-2 solubilizados en f-CD (nLG-SB+IL-2). La CD (β -CD succinilada aleatoriamente; CTD, Inc.) se funcionalizó con metacrilato de 2-aminoetilo agitando una relación molar 1:3 de los compuestos en 1X PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. El SB se incorporó a f-CD añadiendo el fármaco disuelto en metanol al f-CD. Después de 20 minutos de agitación vigorosa a temperatura ambiente para formar los complejos, el metanol se evaporó con una corriente dirigida de nitrógeno. La etapa de reconstitución continuó con 30 minutos de agitación vorticial para rehidratar los liposomas. Los liposomas se irradiaron luego bajo luz UV durante 8 minutos con una lámpara ultravioleta de onda larga Blak-Ray (Modelo B 100) a una distancia de trabajo de 10 cm. Directamente antes de la irradiación UV, las muestras se diluyeron cinco veces para evitar la gelificación a macroescala. Los nanolipogees resultantes se sedimentaron por centrifugación (cinco minutos a 7200 rcf) y se resuspendieron en 1X PBS. Este procedimiento de centrifugación/resuspensión se repitió tres veces. Los nanolipogees se dividieron en partes alícuotas y se congelaron a -20 °C hasta su uso posterior. Para mantener la consistencia, todos los nanolipogees se congelaron antes de su uso (*in vitro* o *in vivo*). El tamaño final y la dispersión se confirmaron resuspendiendo nanolipogees en 1X PBS para análisis en un instrumento de dispersión de luz dinámica ZetaPALS. El potencial zeta de los liposomas de PC/colesterol, los liposomas PC/colesterol/PE-PEG-NH₂ y los nanolipogees se evaluaron en PBS 0,1x usando un nanoescalador Malvern.

Para el análisis TEM, las muestras de nanolipogel se tiñeron con tetróxido de osmio y luego se tomaron imágenes

en un microscopio FEI Tenai Biotwin. La tinción de tetróxido de osmio específica de lípidos de muestras crioseccionadas tenía un patrón de tinción localizado limitado a la membrana exterior de la partícula.

Resultados

5 Los liposomas se usaron como moldes a nanoescala para la formación de hidrogel fotoinducido. Para lograr la liberación sostenida del fármaco hidrófobo junto con proteínas encapsuladas, se incorporaron β -ciclodextrinas (CD) conjugadas con metacrilato en el interior de los liposomas. Las β -ciclodextrinas tienen una larga historia como agentes de solubilización para compuestos hidrófobos y son excipientes clave en diversas formulaciones farmacéuticas.

15 Los complejos con SB o rodamina (para imágenes) con CD funcionalizada se verificó utilizando RMN de ^1H . La CD funcionalizada (f-CD) se une covalentemente a la matriz polimérica encapsulada en liposomas durante la polimerización fotoinducida, por lo tanto, el SB solo puede liberarse tras la hidrólisis de f-CD/SB de los grupos éster poliméricos y la posterior difusión fuera del nanolipogel, permitiendo la liberación sostenida en comparación con la liberación dominada por la explosión de SB en ausencia de CD gelificada. Este sistema permitió el control sobre la liberación de IL-2 cargada remotamente sin comprometer su bioactividad y permitió la liberación simultánea de proteínas y fármacos en comparación con la liberación de un solo componente. El perfil de liberación de nanolipogeles cargados con SB/IL-2 no se alteró por incubación en suero y la liberación se completó sustancialmente a los 7 días.

25 Para demostrar el impacto de la polimerización en el nLG en el perfil de liberación de SB e IL-2, se comparó la cinética de liberación de ambos agentes con la liberación de liposomas y nanopartículas sólidas de poli(lactida-co-glicólido) (NP de PLGA) que encapsulan ambos agentes. La incorporación de polímero fotocurado en el vehículo de nanolipogel permitió una liberación más sostenida de SB en comparación con los liposomas y una liberación más completa en comparación con 50:50 (NP de PLGA) convencionales del mismo diámetro. Se ve que la cinética de liberación del fármaco es intermedia entre la liberación dependiente de difusión de los liposomas y la liberación dependiente de hidrólisis de PLGA. La liberación acumulativa comparativa de IL-2 de liposomas, nanolipogeles y NP de PLGA demostró que la encapsulación de IL-2 en nanolipogeles permitió una mejor liberación sostenida de citocina.

35 La bioactividad de SB e IL-2 no se vio afectada por la incorporación de lipogel. La encapsulación de IL-2 (80 %) y/o fármaco (36 %) no afectó significativamente al diámetro del nanolipogel; el análisis dinámico de dispersión de luz reveló un diámetro medio de 120 nm y un índice de polidispersidad de 0,2. Los liposomas y nanolipogeles que incorporan fosfatidiletanolamina PEGilada con terminación de amina demostraron un potencial zeta neutro, en comparación con el potencial zeta de aproximadamente -22 ± 10 mV de los liposomas formulados solo con fosfatidilcolina y colesterol. La Crio-TEM de nanolipogeles mostró la formación de estructuras liposomales esféricas, detectables por dispersión de la luz incluso después de la interrupción del exterior liposomal por detergente, validando un núcleo de gel interno con aproximadamente el mismo diámetro que el nanolipogel intacto. La citotoxicidad *in vitro* de este sistema fue insignificante.

45 Para investigar la biodistribución y la eliminación de esta plataforma, se utilizó rodamina solubilizada en CD como un modelo de marcador sustituto fluorescente para SB; el complejo de rodamina con CD se había utilizado previamente para calificar las interacciones huésped-hospedador con las CD. Esto fue confirmado aquí por RMN de ^1H .

50 La encapsulación de SB o SB+IL-2 no tuvo un efecto significativo sobre el diámetro medio de partículas o la polidispersidad. La Figura 1D muestra que se descubrió que el potencial zeta de los liposomas y nanolipogeles que incorporan PE-PEG terminado en amina era cercano al neutro. La Figura 1E muestra la composición y las propiedades de formulación de la formulación de nanolipogel. La figura 1F muestra la estructura del polímero verificada por RMN de ^1H . La crio-TEM de los nanolipogeles demostró la formación de estructuras liposomales esféricas. La Figura 1G muestra que el polímero/CD fotopolimerizado forma estructuras de hidrogel nanoparticuladas que son detectables por dispersión de luz incluso después de la interrupción del exterior liposomal por detergente.

Ejemplo 2: Estudios de liberación y bioactividad *in vitro*

Materiales y métodos

60 **Estudios de liberación controlada.** Para demostrar la ventaja de los vehículos de nanolipogel para la liberación controlada de agentes encapsulados durante períodos prolongados de tiempo, se realizaron una serie de estudios para evaluar la liberación *in vitro* de partículas de nanolipogel que contienen SB y/o IL-2. Los estudios de liberación se realizaron a 37 °C con agitación constante en 1X PBS + 10 % de suero fetal bovino. En cada punto de tiempo, se eliminó el volumen completo y se reemplazó con tampón nuevo después de la centrifugación (cinco minutos a 7200 fcr). Los nanolipogeles se resuspendieron mediante pipeteo manual. Las mediciones de absorbancia para determinar las concentraciones de SB se realizaron con un lector de placas Beckman Coulter a 300 nm. Las lecturas de absorbancia de las partículas nLG-Vacío se restaron de las obtenidas de las partículas nLG-SB para garantizar

que las lecturas se debieran solo al SB encapsulado. La liberación de IL-2 se determinó usando un kit ELISA de IL-2 (BD Biosciences) con captura humanizada (BD, 555051) y anticuerpos de detección biotinilada (BD, 555040) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la IL-2 utilizada en estos estudios, la conversión de la unidad internacional fue de 22 MU = 1,3 mg.

Las CD funcionalizada (f-CD) se une covalentemente a la matriz polimérica encapsulada en liposoma durante la polimerización fotoinducida, por lo tanto, el SB solo puede liberarse tras la hidrólisis de f-CD/SB de los grupos éster polimérico y la posterior difusión fuera del nanolipogel, lo que permite la liberación sostenida en comparación con la liberación dominada por la explosión de SB en ausencia de CD gelificada.

Estudios de bioactividad. La liberación acumulada de nLG-IL-2 se realizó a los 1, 3, 5 y 7 días en medios completos [medios RPMI (Gibco) con suero bovino fetal al 10 % (Atlanta Biological) y penicilina/estreptomicina (Sigma) suplementado con L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales (Gibco), tampón Hepes (Sigma), gentamicina (Sigma) y β -mercaptoetanol (Sigma)]. Los esplenocitos se aislaron de un ratón B6 y se añadieron 1×10^6 células en 500 μ l de medios de linfocitos T a cada pocillo de una placa de 24 pocillos previamente recubierta con 10 μ g/ml de anti-CD3 (recubierto durante la noche en IX PBS a 4 °C) y 5 μ g/ml de anti-CD28 soluble (BD Biosciences). Los medios de los estudios de liberación se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,22 μ m (Whatman) y se agregaron 500 μ l a los pocillos. Además, todos los pocillos contenían 5 μ g/ml de anti-CD28 soluble (BD Biosciences). Se añadió IL-2 soluble a concentraciones variables para controlar los pocillos como patrón. Las células se incubaron a 37 °C y se evaluó la estimulación celular después de 72 horas usando un IFN- γ ELISA (BD Biosciences).

Resultados

Las Figuras 2A-2E son perfiles de liberación comparativos de nLG, lipomas y nanopartículas de polímero sólido (PLGA). El SB solubilizado con CD o CD funcionalizada con metacrilato (f-CD) acumulado liberado de nLG normalizados por la masa del vehículo inicial demostró que la polimerización de nanolipogeles mejoró la naturaleza sostenida de la liberación de SB (Figura 2A). Se usó hidroxipropil β -CD para la formación del complejo de SB con la CD no funcionalizada. La IL-2 acumulada liberada determinada por ELISA (inmunoactivo) y por un estudio de bioactividad (bioactivo) a partir de nLG normalizados por la masa inicial de nanolipogel demostró que la bioactividad de IL-2 no se vio afectada por la encapsulación (Figura 2B). La liberación de SB e IL-2 no se vio afectada por la incubación de 10 mg de nLG en 1 ml de suero completo (Figura 2C). La liberación acumulativa comparativa de SB de liposomas, nanolipogeles y nanopartículas poliméricas degradables (poliláctido-co-glicólico) (PLGA NP) demostró que la incorporación de polímero fotocurado en el vehículo de nanolipogel permitía una mejor liberación sostenida y una liberación más completa de la solubilización en ciclodextrina SB (Figura 2D). Los NP de PLGA (diámetro medio = 150 ± 50 nm) se prepararon usando una técnica de doble emulsión de agua/aceite/agua modificada. Los liposomas se prepararon de manera idéntica a la de los nLG sin el núcleo del polímero. Los liposomas se cargaron con IL-2 y SB de forma similar a los nanolipogeles. El porcentaje disminuido de SB encapsulado liberado de NP de PLGA se atribuye a la interacción del polímero relativamente hidrófobo con el SB. Todas las formulaciones en partículas se disolvieron en NaOH 0,1N + SDS al 1 % para determinar el 100 % de liberación a los 7 días (flecha) (Figura 2D). La liberación acumulativa comparativa de IL-2 de liposomas, nanolipogeles y NP de PLGA demostró que la encapsulación de IL-2 en nanolipogeles permitió una mejor liberación sostenida de citocina. La liberación acumulativa se presenta como porcentaje del total de IL-2 liberada durante 7 días (Figura 2E). Los datos en todos los gráficos representan la media de muestras triplicadas ± 1 desviación estándar. La Figura 2F compara los tamaños y la carga de IL-2 y SB en PLGA, nanolipogeles y liposomas.

Este sistema permitió el control sobre la liberación de IL-2 cargada remotamente sin comprometer su bioactividad. La carga de IL-2 en el espacio de hidrogel de polímero fuera de la CD permitió la liberación simultánea de proteínas y fármacos. La disminución de la liberación total de ambos componentes (Figura 2C) en comparación con la liberación de un solo componente probablemente se debió a limitaciones estéricas en el interior del nanolipogel o la disminución de la eficiencia de carga de SB e IL-2. El perfil de liberación de los nanolipogeles cargados con SB/IL-2 no se alteró por incubación en suero y la liberación se completó sustancialmente a los 7 días.

Para demostrar el impacto de la polimerización en el nanolipogel sobre el perfil de liberación de SB e IL-2, se comparó la cinética de liberación de ambos agentes con la liberación de liposomas y nanopartículas sólidas de poli(láctido-co-glicólico) (NP de PLGA) que encapsulan ambos agentes. La incorporación de polímero fotocurado en el vehículo de nanolipogel permitió una liberación más sostenida de SB en comparación con los liposomas y una liberación más completa en comparación con 50:50 (NP de PLGA) convencionales del mismo diámetro. La cinética de liberación del fármaco es intermedia entre la liberación dependiente de la difusión de los liposomas y la liberación dependiente de la hidrólisis del PLGA. La liberación acumulativa comparativa de IL-2 de liposomas, nanolipogeles y NP de PLGA demostró que la encapsulación de IL-2 en nanolipogeles permitió una mejor liberación sostenida de citocina.

Bioactividad. Los vehículos de nanolipogel proporcionan los medios para controlar la liberación de agentes encapsulados sin comprometer la bioactividad. La bioactividad de SB e IL-2 no se vio afectada por la incorporación de lipogel. La producción de IFN- γ se correlacionó con la concentración de IL-2 para determinar la bioactividad.

Ejemplo 3: Caracterización de nanolipogees

La encapsulación de IL-2 (80 %) y/o fármaco (36 %) no afectó significativamente al diámetro del nanolipogel; El análisis dinámico de dispersión de luz reveló un diámetro medio de 120 nm y un índice de polidispersidad de 0,2. Los liposomas y nanolipogees que incorporan fosfatidiletanolamina PEGilada con terminación de amina demostraron un potencial zeta neutro, en comparación con el potencial zeta de -22 ± 10 mV de los liposomas formulados solo con fosfatidilcolina y colesterol. La Crio-TEM de nanolipogees mostró la formación de estructuras liposomales esféricas, detectables por dispersión de la luz incluso después de la alteración del exterior liposomal por detergente, validando un núcleo de gel interno con aproximadamente el mismo diámetro que el nanolipogel intacto. La citotoxicidad *in vitro* de este sistema fue insignificante.

Ejemplo 4: Biodistribución

Para investigar la biodistribución y el aclaramiento de los nanolipogees, la rodamina solubilizada en CD fue un modelo de marcador sustituto fluorescente para SB; el complejo de rodamina con CD se había utilizado previamente para calificar las interacciones huésped-hospedador con las CD. Esto fue confirmado por RMN de ^1H . La farmacocinética *in vivo* de la rodamina después de la administración sistémica se evaluó en ratones sanos que recibieron una única administración intravenosa de nLG-Rhod, una dosis equivalente de rodamina libre o control de PBS mediante inyección en la vena de la cola.

Resultados

El análisis espectrofluorométrico de la rodamina extraída de la sangre mostró $15,7 \pm 4,1$ % y $7,7 \pm 3,7$ % (media \pm d.e.) de la dosis inicial de nanolipogel restante a las 1 y 24 horas respectivamente después de la inyección. La rodamina libre se eliminó rápidamente y no fue detectable en la sangre en ninguno de los puntos temporales tomados después de la inyección.

Las Figuras 3A-3G son gráficos que muestran la liberación controlada, el aclaramiento y la biodistribución. La distribución tanto del vehículo de nanolipogel como de la carga útil del fármaco encapsulado se investigó usando NLG de doble marcado; se incorporó fosfoetanolamina marcada con fluoresceína en el componente lipídico de los nanolipogees cargados de rodamina. El análisis espectrofluorimétrico a 540/625 nm y 490/517 nm mostró fluorescencia dependiente de la dosis sin solapamiento espectral. La Figura 3A es un gráfico de IL-2 acumulativa (ng/mg de nLG) y fármaco (μg de SB/mg de nLG) liberados de nLGs cargados de forma normalizada por la masa del vehículo. Las barras de error en todos los gráficos representan ± 1 desviación estándar. La Figura 3B es un gráfico que muestra el aclaramiento (porcentaje de la dosis inicial) de la dosis del fármaco a lo largo del tiempo en días: la encapsulación en nanolipogees aumentó significativamente el porcentaje restante de la dosis inicial en la sangre a las 1 y 24 horas después de la inyección (prueba t de dos poblaciones, $p < 0,01$ ###). La Figura 3C es un gráfico de distribución de todo el cuerpo. Los ratones recibieron una dosis única de nanolipogel cargado de rodamina o rodamina soluble (en solución salina) por inyección intravenosa en la vena de la cola. Los animales se sacrificaron a las 1, 24, 48 y 72 horas después de la inyección para extracción y cuantificación de la fluorescencia.

La biodistribución de todo el cuerpo se determinó con marcado de rodamina. Se detectaron cantidades significativamente mayores (prueba t de dos poblaciones, $p < 0,01$) de rodamina en los órganos principales de los animales tratados con nanolipogel en comparación con los animales inyectados con colorante libre. La Figura 3D es un gráfico de la acumulación dependiente del tiempo n en el tumor subcutáneo: penetración acumulativa del tumor de rodamina (círculos) después de la inyección peritumoral B16 en ratones B6. Se recogió tejido peritumoral para cuantificar la dosis restante de nLG que rodea el tumor (cuadrados). La liberación controlada demuestra la liberación de rodamina, pero no de lípidos (Figura 3E). Los ratones con tumores B16 subcutáneos recibieron una única inyección IV (vena de la cola) de NLG doblemente marcado. Los animales se sacrificaron a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inyección y los tejidos se recolectaron para homogeneización, extracción y cuantificación de rodamina y fluoresceína-PE. El análisis del suero mostró una circulación prolongada tanto del encapsulante como del vehículo de administración. Se observaron patrones similares de biodistribución entre los lípidos (Figura 3F) y la carga útil de los fármacos (Figura 3G), con mayores acumulaciones de fármacos en los pulmones y el hígado.

El análisis de la biodistribución a los órganos principales mostró que los pulmones, el hígado y el riñón eran sitios primarios de acumulación tanto de rodamina encapsulada en nanolipogel como de rodamina libre. La encapsulación en nanolipogel aumentó tanto la dosis inicial total para la mayoría de los tejidos como la dosis acumulada durante tres días.

Ejemplo 5: Estudios citotóxicos y de seguridad**Materiales y métodos**

Se usó CellTiter-Blue (Invitrogen) como marcador de la viabilidad celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se colocaron células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC) en placas de 96 pocillos a una densidad

de 5×10^4 células/pocillo (excepto el patrón, que contenía una dilución en serie del número de células). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C con diluciones en serie de 1X PBS (control positivo), azida de sodio (control negativo; Sigma), liposomas o nanolipogeles. Los liposomas se fabricaron de manera similar a los nanolipogeles pero, después de la liofilización, se reconstituyeron con PBS puro 1X y no se sometieron a irradiación UV. Los nanolipogeles eran del grupo nLG-Vacío. Después de 24 horas, se añadió el reactivo CellTiter-Blue (20 μ l/100 μ l de volumen). Las células se incubaron adicionalmente durante 4 horas a 37 °C, después de lo cual se granularon y se midió la fluorescencia del sobrenadante. El 100 % de supervivencia celular se define como el promedio de supervivencia del grupo 1X PBS y el 0 % de supervivencia del grupo azida. Todas las muestras se procesaron por triplicado y el experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Para examinar la seguridad *in vivo* de las partículas de nanolipogel, a los ratones C57/B16 se les administró una dosis intravenosa única de nanolipogeles y se midió la toxicología aguda 7 días después. La toxicidad pulmonar se evaluó por histología para determinar si los nanolipogeles administrados por vía sistémica inducían inflamación aguda.

Resultados

No se observaron efectos tóxicos estadísticamente significativos de la administración de nanolipogeles vacíos o nanolipogeles coencapsulados con SB505124 (SB) o IL-2. No se observó hepatotoxicidad, medida por los niveles séricos de fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa. Los intervalos fisiológicos de referencia normales dados por el sistema IDEXX VetTest® para fosfatasa alcalina de ratón y alanina aminotransferasa fueron 62-209 UI/L y 28-132 UI/L, respectivamente. Además, no se observó toxicidad renal, ya que los niveles de nitrógeno ureico en sangre estaban dentro del intervalo de referencia normal de ratón de 18-29 mg/dl. También se realizó un hemograma completo para identificar cualquier toxicidad hematológica. Los recuentos de leucocitos, los recuentos de plaquetas y el contenido de hemoglobina se encontraban dentro de los intervalos fisiológicos normales para ratones (leucocitos: $1,8 - 10,7 \times 10^3$ células/ μ l; plaquetas: $592 - 2971 \times 10^3$ células/ μ l; hemoglobina: 11,0 - 15,1 g/dl). La tinción de hematoxilina y eosina de los pulmones no mostró toxicidad pulmonar evidente. Las estructuras bronquiolar y alveolar parecían normales, y no se observaron alteraciones en las capas epiteliales ni infiltrados inflamatorios en los cortes pulmonares.

Los resultados *in vitro* demuestran que los nanolipogeles tienen toxicidades insignificantes similares a los liposomas.

A ratones sanos C57/B16 se les administró una dosis intravenosa única de terapia de combinación de nanopartículas o controles y se midió la toxicología aguda 7 días después. No se observaron toxicidades significativas en las mediciones séricas de fosfatasa alcalina o alanina aminotransferasa sérica. Los intervalos fisiológicos normales para la fosfatasa alcalina de ratón son aproximadamente 62-209 UI/L y para la alanina aminotransferasa aproximadamente 28-132 UI/L. No se observó toxicidad renal, ya que los niveles de nitrógeno ureico en sangre estaban dentro del intervalo de referencia normal de ratón de 18-29 mg/dl. Los hemogramas completos demostraron que los intervalos fisiológicos normales son recuentos de leucocitos, recuentos de plaquetas y contenido de hemoglobina. La toxicidad pulmonar se evaluó por histología para determinar la presencia de inflamación aguda. La tinción de hematoxilina y eosina de los pulmones no mostró toxicidad pulmonar obvia ni infiltrados inflamatorios; las estructuras bronquiolar y alveolar parecían normales sin alteración de las capas epiteliales.

Ejemplo 6: Administración de fármacos a los tumores y actividad antitumoral: tumores subcutáneos

Se determinaron los efectos de las monoterapias con IL-2 y antagonista de TGF- β para mejorar las respuestas antitumorales contra melanomas B16.

Materiales y métodos

Se utilizó una prueba *t* pareada (dos colas) para analizar las diferencias en las áreas y masas tumorales. Se utilizaron OriginPro versión 8.1 (Microcal) y Prism versión 5.01 (GraphPad Software, Inc.) para los análisis. Los estudios de supervivencia se analizaron mediante las pruebas de Kaplan-Meier y Wilcoxon-Gehan con Origin.

Estudios de tumores subcutáneos *in vivo*. Las células B16-F10 (ATCC) se cultivaron en DMEM (Gibco) y se suspendieron a 2×10^6 células/ml en 1X PBS (mantenido en hielo) directamente antes de la inyección. Para estudios de tumores subcutáneos, se sedaron ratones albinos B6 hembra de 6-8 semanas con AErrane (isofluorano; Baxter) y se afeitó el flanco trasero derecho antes de una inyección subcutánea de 50 μ l de la suspensión celular. Los tumores fueron controlados y el tratamiento comenzó cuando el área promedio del tumor alcanzó aproximadamente 5,5 mm² (8-10 días después de la inyección de B16; los ratones se reorganizaron para normalizar el tamaño del tumor en los grupos). Los ratones fueron sedados con isofluorano para la administración intratumoral de nanolipogel. Cada dosis consistió en 5 mg de nanolipogeles.

Los observadores desconocían el área del tumor y los estudios de supervivencia. Los ratones se sacrificaron con dióxido de carbono cuando cualquier dimensión tumoral era mayor de 15 mm, cuando mostraban algún signo de

enfermedad, o una semana después del tratamiento para los estudios de análisis FACS. El estudio de administración *in vivo* usó inyecciones de 5 mg/ratón de nanolipogeles cargados de rodamina (Sigma) solubilizada en f-CD, preparados como se describió anteriormente para nLG-SB. Se sacrificaron cinco ratones por grupo en diferentes puntos temporales y se extrajeron y pesaron los tumores.

La rodamina se extrajo homogeneizando los tumores en 500 µl de agua desionizada (DI). Se utilizaron dos ciclos de congelación/descongelación a -80 °C/temperatura ambiente para garantizar que las células se lisaron completamente, luego se homogeneizaron los homogeneizados a temperatura ambiente y se añadieron 40 % (v/v) de dimetilsulfóxido y 1 % (v/v) de TWEEN® 80 para disolver las partículas. Después de agitar en vórtex, los homogeneizados se congelaron a -80 °C durante 24 horas, se descongelaron a temperatura ambiente y se agitaron en vórtex durante 10 minutos, luego se sedimentaron los restos celulares mediante centrifugación de 30 minutos a 13.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se midió la fluorescencia con excitación 540 nm/emisión 625 nm.

Nanolipogel *in vivo*

Como la encapsulación en nanolipogeles disminuyó la eliminación del fármaco libre y mejoró la biodistribución, la terapia localizada de tumores subcutáneos se evaluó primero para evaluar la eficacia terapéutica. La administración intratumoral semanal de SB soluble sola no logró retrasar el crecimiento tumoral (Figura 4A), lo que es consistente con los resultados previos usando LY364947 en modelos preclínicos de cáncer de próstata y gástrico en animales. Se observó un efecto nulo similar cuando tanto el SB soluble como la IL-2 se administraron conjuntamente en dosis semanales (Figura 4A). El SB encapsulado en nanolipogel administrado individualmente (nLG-SB) retrasó significativamente el crecimiento tumoral (Figura 4A), lo que resultó en ratones con tumores más pequeños después de una semana de terapia (Figura 4B). Aunque la IL-2 encapsulada en nanolipogel administrada individualmente (nLG-IL-2) no retrasó significativamente el crecimiento tumoral (Figura 4A), las masas tumorales en una semana fueron significativamente más pequeñas que los tumores obtenidos de ratones en el grupo de control (Figura 4B).

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que demuestran la eficacia de la liberación sostenida de IL-2 o moléculas pequeñas que inhiben la señalización de TGF-β sobre los pulsos de estos agentes para mejorar las respuestas antitumorales. Al comparar todos los grupos de tratamiento, se observó la reducción más notable y significativa tanto en la tasa de crecimiento tumoral como en la masa tumoral después de una semana de terapia en los ratones que recibieron administración sostenida simultánea de SB e IL-2 (Figs. 4A y 4B).

Resultados

El tamaño del tumor en ratones tratados y no tratados se correlacionó con su supervivencia (Figura 4A; 4C). La administración de SB soluble o SB en combinación con IL-2 no mejoró la supervivencia sobre los controles no tratados, mientras que las formulaciones de nanolipogel de IL-2 o SB solo aumentaron moderadamente los tiempos de supervivencia promedio (Figura 4C). Por el contrario, la inmunoterapia combinada administrada con nanolipogel aumentó drásticamente la supervivencia (Figura 4C). Como se observó con los datos de cinética tumoral, la administración de partículas que liberan cada agente mejoró ligeramente la supervivencia; sin embargo, los ratones que recibieron terapia de combinación a través de partículas que liberan ambos agentes demostraron tumores notablemente más pequeños y una supervivencia más larga en comparación con los otros grupos de tratamiento. De los animales que recibieron nLG-SB+IL-2, el 100 % sobrevivió hasta el punto final del estudio a los 35 días después de la implantación inicial del tumor. Se observó regresión tumoral completa y supervivencia en una cohorte (40 %) del grupo durante 60 días (Figura 4C).

La administración de fármacos a los tumores después de la inyección peritumoral localizada de nLG cargado con rodamina (nLG-rod) se evaluó mediante la medición comparativa de las concentraciones de rodamina en tumores frente a tejidos peritumorales. El perfil farmacocinético sugirió la administración sostenida del fármaco desde el depósito localizado de nLG: a las 24 horas después de la administración peritumoral, solo el 3 ± 1 % de la dosis inicial había penetrado en la masa tumoral y el 36 ± 17 % de la dosis inicial permaneció en los tejidos circundantes. En el transcurso de 7 días, la concentración acumulada de rodamina en el tumor aumentó a 25 ± 0,5 % de la dosis inicial, mientras que la concentración total de rodamina en el tejido peritumoral disminuyó a 4 ± 2 % de la dosis inicial.

Ejemplo 7: Estudios de biodistribución y seguridad del nanolipogel *in vivo* y tumor pulmonar metastásico

Una necesidad insatisfecha significativa es la biodistribución mejorada de citocinas de corta duración y fármacos hidrófobos en el tratamiento de tumores metastásicos distantes. Los ratones genéticamente modificados que contienen linfocitos T resistentes a la señalización de TGF-β anularon el desarrollo de depósitos de melanoma B16 metastásico en los pulmones, proporcionando una motivación adicional para evaluar el bloqueo de TGF-β con y sin terapia con IL-2 en este modelo tumoral. En este modelo se probó el efecto de la terapia de nanolipogel sistémico contra metástasis pulmonares B16 altamente agresivas. Previamente se había demostrado que la inyección intravenosa de células B16 produce un rápido crecimiento del tumor metastásico en los pulmones de ratones B6.

Materiales y métodos

Los melanomas B16 metastásicos se establecieron en ratones B6 hembra de 6-8 semanas de edad por administración intravenosa (vena de la cola) de 50 µl de suspensión celular B16 como se describe en Gorelik et al. Nat Med 7, 1118-1122 (2001). El tratamiento se inició 7 días después, consistiendo cada dosis en nanolipogeles de 5 mg administrados por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados cuando exhibían crecimientos tumorales externos, parálisis o debilidad, pérdida de peso significativa, o 14 días después del primer tratamiento para estudios de análisis FACS. Después del sacrificio, se expuso la cavidad torácica y se perfundieron los pulmones haciendo una pequeña incisión en la aurícula derecha e inyectando 10 ml de PBS frío en el ventrículo derecho. Las metástasis pulmonares fueron contadas por observadores enmascarados que registraron masas circulares oscuras que van desde 0,1 a 3 mm como tumores únicos.

Los estudios de biodistribución de nanolipogeles se realizaron en ratones sanos y portadores de tumores después de la inyección (local o sistémica) de 5 mg de nanolipogeles cargados de rodamina solubilizada en f-CD (con o sin marcaje de fluoresceína del vehículo de lípidos). La rodamina se extrajo de los tejidos homogeneizados y se cuantificó como se describió anteriormente. La toxicología aguda se evaluó en ratones C57/B16 sanos siete días después de una dosis intravenosa de control de tampón, nanolipogeles vacíos o nanolipogeles cargados con SB e IL-2. La hepatotoxicidad y la toxicidad renal se evaluaron mediante la medición de los niveles séricos de fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa y nitrógeno ureico en sangre. Se realizó un hemograma completo para identificar cualquier toxicidad hematológica. Finalmente, la toxicidad pulmonar se evaluó por histología para determinar si los nanolipogeles administrados por vía sistémica inducían alguna inflamación aguda.

El tejido tumoral resecado se fijó en formalina al 10 % durante 24 horas y luego se incluyó en parafina. Los bloques de tejido se cortaron en rodajas de 5 µm y se montaron en portaobjetos de vidrio seguido de tinción con hematoxilina y de leucocitos y usando conjugado anti-LCA (CD45)-peroxidasa (1 µg/ml) (Life technologies).

Se usó un microscopio de fluorescencia Olympus BX61WI en combinación con un objetivo Olympus 20X, 0,95NA y el sistema de microscopía de dos fotones LaVision Biotec para obtener imágenes de la vasculatura tumoral y la acumulación de nanolipogel en los tumores. Brevemente, se hicieron incisiones para exponer colgajos de piel que rodean tumores subcutáneos en ratones C57BL/6 anestesiados. La adquisición de imágenes intravitales se inició 5 minutos después de la administración intravenosa de nanolipogeles. Para la fuente de luz de excitación se utilizó un láser de dos fotones de zafiro de titanio autoajustable (Chameleon Vision II, coherente) bombeado por una fuente de láser Verdi. La luz emitida se recogió con detectores externos equipados con los siguientes filtros de paso de banda: 435/90 nm, 525/50 y 615/100. El campo de visión para cada plano xy era de 400 µm x 400 µm o 500 µm x 500 µm, a una resolución de 0,8 µm por píxel. Se adquirieron pilas de entre 26 y 101 secciones ópticas con 1 o 2 µm de separación z cada 60 s en el transcurso de una hora con el láser configurado a una longitud de onda de 850 nm o 940 nm. El software Volocity® (Improvision) se utilizó para crear secuencias de pilas de imágenes.

Resultados

Los linfocitos infiltrantes del tumor se aislaron de melanomas B16 como se describe por Petersen et al. J Immunother 29, 241-249 (2006). Los tratamientos se administraron mediante inyección en la vena de la cola y se iniciaron una semana después de la inyección celular para evaluar la eficacia contra los tumores en crecimiento. Como fue el caso en ratones con tumores subcutáneos, se observó un beneficio de supervivencia máximo en el grupo que recibió la terapia de combinación encapsulada en nanolipogel. El análisis de Mantel-Cox demostró un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) en la supervivencia sobre los animales que recibieron solución salina sola, es decir, sin tratamiento (Figura 5a). La mitad de los animales que recibieron nLG-SB+IL-2 sobrevivieron hasta alcanzar el punto final del estudio a los 45 días. (Figura 5a).

Para examinar el efecto del tratamiento sobre la carga tumoral, se sacrificaron los animales dos semanas después del tratamiento inicial y se inspeccionaron visualmente muestras de pulmón completo en busca de depósitos de melanoma. La administración de SB soluble con o sin co-terapia con IL-2 no logró reducir el número de tumores pulmonares a las tres semanas (Figura 5b). La reducción máxima de la carga tumoral se observó en animales que recibieron la terapia de combinación administrada con nanolipogel (Fig. 5b).

La biodistribución comparativa se repitió en ratones con tumores pulmonares metastásicos B16. Se utilizaron nanolipogeles doblemente marcados formulados mediante la incorporación de PEG-fosfoetanolamina marcada con fluoresceína en la membrana lipídica de nanolipogeles cargados de rodamina para evaluar el tráfico de las partículas frente al tráfico de la carga útil. El PEG marcado con fluoresceína no interfirió con la detección o liberación de rodamina. Los ratones portadores de tumor pulmonar recibieron una dosis IV única (vena de la cola) de nanolipogel con doble marcado. Las metástasis B16 a menudo eran visibles como nódulos irregulares de aproximadamente 1 mm bajo observación de campo brillante, mientras que el lípido marcado con fluoresceína del vehículo de administración y la rodamina se detectaron bajo filtros fluorescentes hasta 24 horas después de la administración. La detección fluorescente de lípidos disminuyó significativamente 4 días después de la administración.

Para evaluar la acumulación de nanolipogel y fármaco en tumores distantes más allá del tejido pulmonar, se

repetieron los experimentos de biodistribución en ratones con tumores subcutáneos distantes. Después de la inyección intravenosa, las concentraciones de lípidos y rodamina se cuantificaron en tumores subcutáneos y en tejidos homogeneizados en varios puntos temporales después de la administración. Se observaron concentraciones tumorales máximas de lípidos y rodamina, $8,8 \pm 4,0$ % y $2,5 \pm 0,8$ % por gramo de tumor, respectivamente, un día después de la administración. Un análisis de todos los tejidos confirmó patrones de biodistribución que fueron similares para los componentes de lípidos y rodamina del sistema de nanolipogel, lo que indica que la carga útil del fármaco se asoció con las partículas durante la biodistribución. El tráfico de nanolipogeles y la carga útil dentro de la vasculatura de los tumores se validó mediante imágenes de tumores subcutáneos con microscopía intravital de escaneo láser de dos fotones con resolución temporal después de la inyección intravenosa. La acumulación de nanolipogeles marcados con fluoresceína a lo largo de la vasculatura se detectó tanto en las áreas que rodean los tumores como dentro del tumor dentro de los 30 minutos posteriores a la inyección intravenosa. El tráfico de partículas en la vasculatura tumoral estuvo acompañado por un aumento en la fluorescencia encapsulante en el microambiente tumoral. La extravasación de rodamina fue evidente en el tejido peritumoral, así como en los espacios intersticiales entre las células tumorales.

El PEG marcado con fluoresceína no interfirió con la detección o liberación de rodamina. Un análisis de todos los tejidos confirmó patrones de biodistribución que fueron similares tanto para los componentes de lípidos y rodamina del sistema de nanolipogel como para el tumor dentro de los 30 minutos posteriores a la inyección intravenosa.

20 Ejemplo 8: Mecanismos inmunológicos de los efectos antitumorales de nanolipogeles

Materiales y métodos

Para dilucidar los mecanismos inmunológicos detrás de los efectos terapéuticos de la terapia de combinación de liberación sostenida y la contribución relativa de cada agente administrado como monoterapias, se recogieron y evaluaron linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en ratones sacrificados una o dos semanas después de la dosis terapéutica inicial. Este punto temporal se eligió en función del momento en el que los ratones de todos los grupos habían desarrollado tumores subcutáneos de tamaño suficiente (hasta 10 mm en su mayor dimensión) o un número suficiente de tumores pulmonares (más de cinco), para aislar un número adecuado de TIL para el análisis.

Los linfocitos infiltrantes de tumores se aislaron de melanomas B16. En resumen, se extirparon tumores subcutáneos o pulmonares de ratones, se pesaron, se trocearon en secciones de aproximadamente 3 mm en su mayor dimensión, y luego se colocaron en 8 ml de medio RPMI sin suero (Irving Scientific Santa Anna, CA) que contenía 175 U/ml de Colagenasa IA (Sigma, N.º C9891) para tumores subcutáneos o 100 U/ml de Colagenasa IV (MP Biomedical, N.º 195110) para tumores de pulmón. La suspensión de tejido resultante se incubó a 37 °C durante 1 hora, se pasó a través de un filtro de tejido de 70 µm y las células resultantes se lavaron dos veces en medio RPMI sin suero. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml de medio RPMI y luego se superpuso sobre medio M de linfocito de ratón (Accurate Chemical, Westbury, NY) para el aislamiento de linfocitos, seguido de centrifugación a 1500 × g según las instrucciones del fabricante (Accurate Chemical). La capa leucocitaria resultante se retiró y se lavó en medio RPMI como se describió anteriormente y posteriormente se resuspendió en 1 ml de 1X PBS que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % (Sigma). Se contaron todas las suspensiones de células para determinar el número absoluto de TIL aislados y posteriormente se distribuyeron a placas de 96 pocillos para tinción y análisis de FACS.

Se usó un citómetro de flujo Becton Dickenson LSR II para cuantificar el porcentaje de células efectoras inmunitarias (linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos NK), así como Tregs en los ratones portadores de tumores evaluando la expresión en la superficie celular de CD4, CD8, NK1.1, TCR-beta, así como FoxP3 intracelular según las instrucciones del fabricante (eBioscience) San Diego, CA). Los números de células absolutos se evaluaron mediante recuento directo en un contador de células Coulter. El anti-CD4 (conjugado con azul Pacífico, N.º 558107), el anti-CD8-a (conjugado con peridrina-clorofila-proteína (PercP), N.º 553036), el anti-NK1.1 (conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), N.º 553164), el anti-TCR-beta (conjugado con alofocianina (APC), N.º 553174), el anti-CD44 (conjugado con FITC, N.º 553133) y el anti-CD62L (conjugado con APC, N.º 553152) se adquirieron en Becton Dickenson Pharmingen. El kit anti-FoxP3 (que contiene el anticuerpo FoxP3 conjugado con ficoeritrina, N.º 72-5775-40) se adquirió en eBioscience.

Las células se incubaron con cócteles de anticuerpos de 40 µl diluidos apropiadamente (según las instrucciones del proveedor) en 1X PBS que contenía BSA al 0,5 % y una dilución 1:200 de anticuerpo bloqueador de Fc 2,4G2 (anti-CD16/32) para evitar la unión inespecífica. Las células se incubaron con los cócteles de anticuerpos durante 30 minutos a 4 °C y luego se lavaron una vez antes del análisis en el citómetro de flujo LSR II Green. Para la tinción intracelular de FoxP3, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron usando un kit de tinción FoxP3 comprado (eBiosciences).

Todos los datos de FACS se analizaron utilizando el software FloJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Se determinaron los Tregs CD4 absolutos, los linfocitos T CD8 y los linfocitos NK multiplicando los números absolutos de TIL normalizados por gramo de tumor por los porcentajes (activados primero en vivo, TCR-β+/-) de linfocitos CD4⁺/FoxP3⁺, CD8⁺ o NK1.1⁺/TCR-β medidos por el citómetro de flujo LSR II Green. Las relaciones CD8/Treg se

obtuvieron dividiendo el número absoluto de linfocitos T CD8 por el número absoluto de linfocitos T reguladores.

Los anticuerpos NK1.1 se aislaron del hibridoma HB191 como se describe por Yokoyama, W.M. Monoclonal antibody supernatant and ascites fluid production, en Curr Prot Immunol (ed. Margulies, D.H.) 2.6.1-2.6.9 (John Wiley & Sons, Nueva York, 2000). Estos anticuerpos se inyectaron por vía intraperitoneal un día antes de la inyección de B16 y posteriormente cada siete días. Cada inyección fue de 250 μ l de una solución de 1 mg/ml.

Para confirmar que el agotamiento de NK se produjo con éxito en ratones tratados con el anticuerpo anti-NK1.1, se obtuvieron aproximadamente 300 microlitros de sangre y los bazo de ratones con NK agotados y con NK presentes. La sangre periférica y los esplenocitos que se obtuvieron mediante disociación mecánica se trataron con tampón de lisis ACK (Lonza, Walkersville, MD) según el protocolo del fabricante y posteriormente se tiñeron para NK1.1 o TCR- β utilizando los anticuerpos descritos en el texto. Los porcentajes de células NK1.1/TCR-beta negativo indicadas en los cuadrantes inferiores derechos en la Figura complementaria 8, muestran el éxito del agotamiento de NK con anticuerpos anti-NK1.1.

Resultados

Se evaluaron los efectos de las monoterapias de antagonistas de IL-2 y TGF- β para mejorar las respuestas antitumorales contra melanomas B16. A medida que disminuyó la encapsulación en nanolipogeles, aumentaba el aclaramiento del fármaco libre y la biodistribución, lo que resultó en ratones con tumores más pequeños después de una semana de terapia, las masas tumorales en una semana fueron significativamente más pequeñas que los tumores obtenidos de ratones en el grupo de control.

Administrada en nanolipogeles sola o en combinación con SB, IL-2 aumentó tanto el porcentaje como el número absoluto de linfocitos T CD8⁺ activados en tumores (Figura 6a; Figura 6b) con un impacto mínimo en las relaciones generales CD4/CD8 y T_{reg}, resultados que fueron consistentes con los resultados clínicos descritos. Las imágenes histológicas representativas de tumores mostraron que IL-2 aumentó significativamente la infiltración de linfocitos en los tumores. La administración sostenida de esta citocina también aumentó las relaciones CD8⁺ activados:T_{reg} en poblaciones de TIL. (Figura 6c)

El tratamiento con nLG-SB aumentó significativamente las poblaciones de CD8⁺ activados ($P < 0,05$), al igual que el tratamiento con nLG-IL-2 o nLG-SB+IL-2 ($P < 0,001$), sobre partículas descargadas (nLG-Vacío). Todos los grupos tienen relaciones significativamente mayores ($P < 0,05$) en comparación con nLG vacíos.

Sin embargo, estos datos no explicaron completamente los resultados observados en ratones que reciben partículas que liberan IL-2 y SB, lo que sugiere que otro mecanismo puede estar involucrado en los efectos antitumorales aumentados observados en los ratones tratados. Dado que el TGF- β también puede regular el número y la función de los linfocitos NK, se evaluó si este tipo de célula estaba involucrada en el componente innato del sistema inmunitario presente en los TIL. En marcado contraste con el número relativo de TIL, los T_{reg} observados en todos los ratones portadores de tumores, la administración sostenida de SB en combinación con IL-2 dio como resultado un porcentaje sustancialmente mayor (Figura 6a) y números absolutos (Figura 6c) de linfocitos NK presentes en lechos tumorales en comparación con los grupos que recibieron partículas "vacías" o partículas que liberan IL-2 o SB solo.

Para validar que el beneficio terapéutico observado en ratones tratados con partículas que liberan ambos agentes dependía de los linfocitos NK, se realizaron estudios en ratones con depleción de linfocitos NK. Los anticuerpos anti-NK1.1 se usaron para agotar los linfocitos NK en los ratones y las células tumorales se inyectaron en ratones con agotamiento de linfocitos NK y ratones que retienen células NK. Los ratones fueron sacrificados una semana después del tratamiento inicial y se midieron las masas tumorales.

En comparación con el grupo de partículas vacías, significativamente más linfocitos NK estaban presentes en los pulmones después del tratamiento con nLG-SB+IL-2 ($P < 0,05$), nLG-SB ($P < 0,05$), y nLG-IL-2 ($P < 0,01$). El grupo tratado con nLG-SB+IL-2 tiene significativamente más linfocitos NK que el grupo control ($P < 0,01$), el grupo tratado con SB ($P < 0,05$), y el grupo tratado con IL-2 ($P < 0,01$). El grupo WT tratado con nLG-SB+IL-2 tiene tumores significativamente más pequeños que todos los demás grupos de tratamiento ($P < 0,001$). Los grupos NKD nLG-SB y nLG-SB+IL-2 tienen tumores significativamente más grandes que sus contrapartes WT (ambos $P < 0,001$). Los estudios se repitieron 2-3 veces con resultados similares.

El agotamiento de NK no afectó el tamaño de los tumores en ratones que reciben partículas que liberan IL-2 solo (Figura 6b). Por el contrario, la ausencia de estas células anuló el retraso en el crecimiento tumoral en animales que reciben partículas que liberan SB e IL-2 (Figura 6b). Hubo un modesto beneficio terapéutico en los ratones que recibieron partículas que liberaron el fármaco solo que fue anulado por el agotamiento de NK (Figura 6b). Hubo un aumento modesto y estadísticamente significativo de linfocitos NK en los TIL de los ratones tratados con partículas que liberan SB solo (Figura 6c).

Por lo tanto, el beneficio terapéutico máximo observado en ratones tratados con partículas que administran

simultáneamente terapias SB e IL-2 probablemente se relacionó con un mayor número de linfocitos NK en el sitio del tumor, lo que tuvo como resultado un aumento de las poblaciones de células efectoras en el tumor.

5 Es importante destacar que los efectos clínicos después de la terapia sistémica fueron consistentes con los resultados de la terapia localizada y la biodistribución de fármacos. La encapsulación en nanolipogel aumentó tanto la dosis inicial a los pulmones como la persistencia de la dosis durante un período de tres días; en el tercer día después de la administración, se midió $9,0 \pm 0,8$ % (media \pm d.e.) de la dosis inicial de nanolipogeles en los pulmones en comparación con $1,5 \pm 0,7$ % de fármaco soluble. Este efecto farmacocinético se correlaciona con una mayor supervivencia y una disminución significativa en el número de tumores. El análisis de los linfocitos infiltrantes de pulmón demostró que, como se observa en los tumores subcutáneos que reciben tratamientos intratumorales con nLG-SB+IL-2, el número aumentado de CD8⁺ activados (Figura 5a) y células efectoras NK (Figura 6a) mediaron la abrogación tumoral y aumentaron la supervivencia. Estos datos indican que se pueden lograr respuestas antitumorales significativas contra el melanoma metastásico mediante la administración sostenida y combinada de un fármaco inhibidor de TGF- β e IL-2 en un modo de administración clínicamente relevante.

15 **Ejemplo 9: Distribución comparativa de vehículo de nanolipogel y encapsulante**

Materiales y métodos

20 La distribución tanto del vehículo de nanolipogel como de la carga útil del fármaco encapsulado se investigó utilizando nanolipogeles con doble marcado. Se incorporó fosfoetanolamina marcada con fluoresceína en el componente lipídico de nanolipogeles cargados de rodamina. El análisis espectrofluorimétrico a 540/625 nm y 490/517 nm demostró una fluorescencia dependiente de la dosis sin solapamiento espectral. Hubo liberación controlada de rodamina, pero no de lípidos.

25 Los ratones con tumores B16 subcutáneos recibieron una única inyección IV (vena de la cola) de NLG doblemente marcado. Los animales se sacrificaron a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inyección y los tejidos se recogieron para homogeneización, extracción y cuantificación de rodamina y fluoresceína-PE.

30 **Resultados**

El análisis del suero mostró una circulación prolongada tanto del encapsulante como del vehículo de administración. Se observaron patrones similares de biodistribución entre la carga útil de lípidos y fármacos, con mayores acumulaciones de fármacos en los pulmones y el hígado.

35 **Ejemplo 10: Dendrimeros encapsulados lipídicos para la administración combinada de ácidos nucleicos, proteínas y fármacos**

40 Los dendrimeros encapsuladores de nanolipogel incluyen una cubierta principal que consiste en un liposoma que encapsula un fármaco y un complejo de ARNip/dendrímico que se inserta en las células. Los polímeros dendríticos (dendrimeros) son una clase de polímeros monodispersos que se distinguen por su estructura de ramificación repetida que emana de un núcleo central. Esta ramificación, que es inherente a la síntesis divergente de dendrimeros, conduce a un crecimiento geométrico del polímero que puede aproximarse casi a una esfera con ramificaciones aumentadas o generaciones superiores (generación 6 o superior). Esta ramificación crea un núcleo ideal para atrapar varias pequeñas moléculas hidrófobas, como fármacos, así como la formación de complejos con ácidos nucleicos. Por ejemplo, SUPERFECT® es un agente de transfección de dendrímico activado disponible comercialmente. En combinación con su distribución estrecha de peso molecular y su pequeño tamaño (menos de 10 nm), los dendrimeros se han utilizado para una gran cantidad de aplicaciones, incluida la administración de fármacos y genes. Los dendrimeros formando complejos con ácidos nucleicos se pueden eliminar rápidamente tras la administración *in vivo* y, por lo tanto, el direccionamiento protector de este complejo sería una modalidad más atractiva para la administración específica del sitio. La formulación liposómica cumple dos funciones: 1) encapsulación protectora de liposomas en complejos con ARNip y 2) facilitar la administración de fármacos hidrófilos de molécula pequeña como ribavirina o proteínas como IFN α . El complejo del núcleo interno del dendrímico con ARNip: los ácidos nucleicos generalmente se estabilizan mediante polímeros catiónicos en una formación de polipéptidos similar al empaquetamiento fisiológico de los ácidos nucleicos alrededor de las histonas. Los dendrimeros de poliamidoamina catiónica (PAMAM), de 5^a generación (G5), diámetro 5,4 nm, sirven para este propósito.

60 **Materiales y métodos**

Los poliplexes de ARNip/Dendrímico se forman combinando PAMAM G5 y ARNip en una relación de amina a fosfato (N/P) de 1:1 a 10:1. La proporción precisa que producirá un silenciamiento óptimo puede determinarse mezclando stock de ARNip y PAMAM en diferentes relaciones molares durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón HEPES 10 mM estéril, pH 7,2 con agitación vortical ligera. Este procedimiento produce un poliplex de dendrímico-ARNip con una carga (potencial zeta) de +20 o superior y un diámetro efectivo de 10 nm, que es adecuado para la encapsulación en liposomas. A continuación, el poliplex se co-encapsula con el fármaco (IFN α y/o

ribavirina) en la partícula liposomal. Una película lipídica deshidratada compuesta de diestearoil-glicerofosocolina (DSPC), colesterol y diestearoilglicero-fosfoetanolamina (DSPE) con un espaciador de polietilenglicol (PEG2000) terminado en amina (DSPE-PEG2000-NH₂) se mezcla primero en la relación molar de 65:30:5, luego se rehidrata bajo sonicación con una solución de 10 mg/ml de poliplex ARNip/Dendrímico y fármaco. La relación entre fármaco y ARNip/dendrímico en solución se puede ajustar durante la formulación. La proporción óptima está dictada por estudios de eficacia *in vitro* e *in vivo*. La PEGilación lipídica "incorporada" intrínseca facilita un mayor tiempo de circulación en comparación con las partículas sin PEG. La incorporación de PEG produce un escudo de barrera de hidratación estérica que facilita una circulación *in vivo* prolongada (es decir, evitación del sistema reticuloendotelial y la captación no específica por parte de los macrófagos).

Después de mezclar el fármaco y el poliplex ARNip/Dendrímico en presencia de lípidos, la solución se extruyó a través de una serie de filtros. Primero tres veces a través de un filtro de 5 µm, tres veces a través de un filtro de 1 µm y cinco veces a través de un filtro de 200 nm que recoge el material extruido en un tubo estéril. El exceso de complejo de ARNip, el fármaco y los lípidos se eliminan centrifugando durante 45 minutos a 24000 rpm a 4°C (3X) en una ultracentrífuga.

La Figura 7A es un esquema de preparación de LED que encapsula el poliplex de ARNip/dendrímico y combinaciones de fármacos, con modificación covalente de la cubierta externa con anticuerpos dirigidos o fragmentos variables de cadena única (scFv). La unión de anticuerpos o scFv al liposoma terminado con amina se logra activando la proteína en tampón 0,1 MES (pH 5,5) en presencia de etildicarbodiimida y N-hidroxisuccinimida durante 10 minutos seguido de la adición de partículas en solución salina tamponada (pH 7,4). Esta reacción activa los grupos carboxilato en la proteína para el enlace covalente con los grupos amina expuestos en las partículas (ref). Inicialmente, la estequiometría de la reacción se ajusta para producir una densidad aproximada de 1-10 moléculas de scFv por partícula, sin embargo, esta densidad puede aumentarse fácilmente variando la estequiometría de la reacción para facilitar la internalización máxima. El tiempo total para la reacción es de 30 minutos a temperatura ambiente. Estas condiciones de reacción no tienen efecto sobre la integridad o la función de los agentes encapsulados.

Se probó la capacidad de los LED para administrar un vector de expresión funcional (pGFP) en células BMDC, HeLa, 293T usando diferentes β-ciclodextrinas (CD) conjugadas con metacrilato y una relación Nitrógeno/Fósforo (N/P), y se comparó con la administración del vector usando LIPOFECTAMINE® 2000 y liposomas.

Los LED también fueron probados para determinar la capacidad de administración de ARNip funcional. Jurkat (línea de linfocitos T humanos) se incubaron con LED que encapsulan ARNip contra CD4 o Luciferasa (Luc) y se funcionalizaron en la superficie con anti-CD7 para mediar la internalización.

Resultados

Los LED pueden facilitar la internalización del fármaco como se muestra en la Figura 7A con macrófagos en cultivo. El fármaco metotrexato (MTX) se utilizó como fármaco modelo. La Figura 7B muestra la citotoxicidad de LED y LED que encapsulan el fármaco modelo metotrexato (MTX). Las barras indican diluciones sucesivas de LED o fármacos o combinaciones a partir de (1 mg/ml de izquierda a derecha a 10 µg/ml). La azida se usa como control positivo para la muerte celular. Comenzando en 10 %, de izquierda a derecha, y aumentando a 1 %, el gráfico muestra que, en comparación con el fármaco libre (MTX), los LED que contienen MTX fueron ligeramente menos tóxicos, presumiblemente debido al secuestro del fármaco. Los LED solos no mostraron citotoxicidad.

Los LED que encapsulan el colorante rodamina facilitan la internalización y la localización citoplasmática del colorante y los LED que contienen el plásmido pGFP mostraron una mayor eficacia en la transfección de macrófagos en comparación con un agente de transfección estándar como LIPOFECTAMINE®.

Para determinar si los grupos terminales de amina en los dendrímeros PAMAM proporcionan amortiguación endosómica e interrumpen los endosomas por el efecto de esponja protónica, se usó un ensayo con Acridina Naranja (un colorante cuyas propiedades espectrales cambian dependiendo de su ubicación en los endosomas o el citosol) con BMDC, que se trataron con dendrímeros PAMAM de 4ª generación (4G) no modificados o dendrímeros conjugados con moléculas de ciclodextrina (CD) que sustituían y protegían aminas primarias con o sin ionóforo carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). Los resultados indican que de las combinaciones probadas, el dendrímico G4 no modificado era el mejor en la alteración endosómica seguido de G4-3CD (Figura 7C). G4-6CD fue el menos efectivo en la alteración endosómica de las combinaciones probadas, lo que respalda la idea de que el efecto de la esponja de protones está mediado por aminas primarias y la sustitución de aminas con CD disminuye las capacidades de amortiguación.

Los LED también se probaron usando diferentes conjugados de dendrímico (G)-ciclodextrina (CD) y una relación Nitrógeno/Fósforo (N/P), y se compararon con la administración del vector (pGFP) usando LIPOFECTAMINE® 2000 y liposomas en una variedad de tipos de células. La CD afectó significativamente al dendriplex (Figura 7D). Los dendriplexes (de dendrímeros modificados) se transfectan mejor que Lipofectamine 2000 en BMDC. Los LED también se transfectaron mejor que el vector de encapsulación de liposomas en BMDC.

Los LED que encapsulan ARNip contra CD4 o Luciferasa (Luc) y la superficie funcionalizada con anti-CD7 se probaron para determinar la capacidad de mediar en la inactivación del ARNm objetivo de internalización en células Jurkat (línea de linfocitos T humanos). Los resultados indicaron que el LED que administraba ARNip redujo la expresión superficial de CD4, o Luc en relación con los controles (Figura 7E).

En un segundo experimento, se utilizaron LED que incluían 200 µg de dendrímero y 400 pmoles de siGFP (Ctl=LFA:siGFP) para eliminar la expresión de GFP en una línea celular establemente transfectada. Las células 293T-eGFP estables se trataron con dendrímeros durante 4 h en SFDMEM seguido de un examen de la expresión de GFP. Las células tratadas con la mayoría de las combinaciones de conjugados de dendrímero (G)-ciclodextrina (CD) exhibieron una mayor reducción en la expresión de GFP en comparación con los controles simulados y LIPOFECTAMINE®: siGFP (Figura 7F).

Ejemplo 11: Presentación cruzada de antígeno con dendrímeros encapsulados en lípidos

Materiales y métodos

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratón se incubaron con liposomas que encapsulan ovoalbúmina (OVA) sola, dendrímero solo, o tanto OVA como dendrímero (LED).

Resultados

Los controles de las células y los liposomas vacíos mostraron niveles indetectables de tinción de anticuerpos anti-25.D16, que une los complejos MHC Clase I-SIINFEKL. Las células que recibieron LED mostraron el nivel más alto de presentación cruzada de antígeno. *p < 0,05 por ANOVA unidireccional Bonferroni posterior a la prueba. (Ver Figura 8A).

Ejemplo 12: Administración de la vacuna con dendrímeros encapsulados en lípidos

Materiales y métodos

Presentación de antígenos

1x 10⁵ BMDC/pocillo (placa de 96 pocillos) + 25 µl de partículas liposomales. Grupos de partículas:

- a. -/- (partículas nada fuera nada dentro)
- b. -/OVA (nada fuera, OVA encapsulado)
- c. -/G5+OVA (nada fuera, OVA y dendrímero G5 dentro)
- d. -/G5+OVA+CpG
- e. MPLA/- (MPLA fuera, nada dentro)
- f. MPLA/OVA
- g. MPLA/OVA+G5
- h. MPLA/OVA+G5+CpG (MPLA fuera; OVA, dendrímero G5, CpG encapsulado)

Donde OVA = ovoalbúmina, MPLA = monofosforil lípido A, G5 = dendrímero de 5ª generación, CpG = oligonucleótido CpG (ligando TLR9).

El tratamiento se incubó con BMDC durante 24 horas seguido de 4 días de incubación conjunta con esplenocitos WT.

Análisis de la producción de citocinas proinflamatorias

Las BMDC se incubaron con nanopartículas liposomales que encapsulan antígeno y se funcionalizaron en superficie con cantidades crecientes de ligando de TLR CpG durante 24 horas antes del análisis del sobrenadante por ELISA.

Resultados

Las células se tiñeron con 25.D16-PE, un anticuerpo que es específico de los complejos MHC Clase I-SIINFEKL de ratón, según se evaluó para la presentación cruzada de antígeno por citometría de flujo. Los resultados indicaron que las partículas -/OVA inducen alguna presentación cruzada, que fue aumentada por las partículas OVA que contienen dendrímero. Las partículas que combinan MPLA, CpG y dendrímero inducen la mayor cantidad de presentación cruzada. (Ver Figura 8B). La superficie de las nanopartículas liposomales funcionalizadas con CpG también indujo un aumento dependiente de la dosis de la producción de citocina proinflamatoria IL-6. (Ver Figura 8C, comparando partículas en blanco, partículas 0,1 µg CpG/mg, partículas 0,25 µg CpG/mg y partículas 0,5 µg CpG/mg).

REIVINDICACIONES

1. Un nanolipogel que comprende

- 5 (1) un núcleo de matriz polimérica que comprende una molécula hospedadora dispersa en el mismo seleccionada del grupo que consiste en polisacáridos tales como almidones, ciclodextrinas y otros compuestos cíclicos o helicoidales que contienen una pluralidad de anillos de aldosa y disacáridos, criptandos, criptófanos, cavitandos, éteres corona, dendrímeros, resinas de intercambio iónico, calixarenos, valinomycinas, nigericinas, catenanos, policatenanos, carcerandos, cucurbiturilos, esferandos, 10 nanotubos de carbono, fullerenos y materiales hospedantes a base de grafeno, y (2) una capa de lípidos.

2. El nanolipogel de la reivindicación 1 en el que la matriz polimérica, la cubierta lipídica o ambas están reticuladas.

- 15 3. El nanolipogel de la reivindicación 1 que comprende un agente que forma un complejo con la molécula hospedadora, disperso dentro de la matriz polimérica, disperso o unido a la cubierta lipídica, o combinaciones de los mismos.

- 20 4. El nanolipogel de la reivindicación 1, en el que la matriz polimérica comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-ácidos co-glicólicos), polihidroxialcanoatos tales como poli-3-hidroxibutirato o poli-4-hidroxibutirato; policaprolactonas; poli(ortoésteres); polianhidridos; poli (fosfazenos); poli(lactida-co-caprolactonas); poli(glicólido-co-caprolactonas); policarbonatos; poliamidas, polipéptidos y poli(aminoácidos); poliésteramidas; otros poliésteres biocompatibles; poli(dioxanonas); poli(alquilatos de alquileo); poliéteres hidrófilos; poliuretanos; poliésteres; poliacetales; policianoacrilatos; polisiloxanos; copolímeros de poli(oxietileno)/poli(oxipropileno); policetales; polifosfatos; polihidroxi valeratos; oxalatos de polialquileo; succinatos de polialquileo; poli(ácidos maleicos), alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona; poli(óxidos de alquileo); celulosas, ácidos poliacrílicos, albúmina, colágeno, gelatina, prolaminas, polisacáridos, derivados, copolímeros y mezclas de los mismos.

- 30 5. El nanolipogel de la reivindicación 3, en el que el agente se selecciona del grupo de agentes terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico y nutracéuticos que consisten en principios activos de molécula pequeña, proteínas, polipéptidos, polisacáridos y ácidos nucleicos.

- 35 6. El nanolipogel de la reivindicación 5 en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en antibióticos, antivirales, antiparasitarios, citocinas, factores de crecimiento, inhibidores de crecimiento, hormonas, antagonistas hormonales, anticuerpos y fragmentos bioactivos de los mismos, formulaciones de antígenos y vacunas, antiinflamatorios, inmunomoduladores y fármacos oligonucleotídicos, moléculas paramagnéticas, compuestos fluorescentes, moléculas magnéticas y radionúclidos, agentes de imágenes de rayos X y agentes de contraste.

- 40 7. El nanolipogel de la reivindicación 6, en el que el agente se selecciona del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, antimitóticos, antraciclina, antibióticos citotóxicos, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular, talidomida; endostatina; angiostatina; inhibidores del receptor tirosina quinasa (RTK); inhibidores de la tirosina quinasa; inhibidores del factor de crecimiento transformante α o del factor de crecimiento transformante β y anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico.

- 50 8. El nanolipogel de la reivindicación 1 que comprende una cubierta liposómica compuesta de una o más capas concéntricas de lípidos, opcionalmente reticulados, en el que los lípidos pueden ser lípidos neutros, aniónicos o catiónicos a pH fisiológico, y el lípido se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en colesterol, fosfolípidos, lisolípidos, lisofosfolípidos y esfingolípidos, y derivados de los mismos y/o se selecciona del grupo que consiste en fosfatidilcolina; fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol; glicolípidos; esfingomielina, ceramida galactopiranosido, gangliósidos, cerebrosidos; ácidos grasos, esteroides; 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolaminas, 1,2-dihexadecilfosfoetanolamina, 1,2-diestearoilfosfatidilcolina, 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina, 1,2-dimiristoilfosfatidilcolina, sales de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, bromuro de dimetildiodecylamonio, 1,2-diaciloxi-3-trimetilamonio propanos, N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N-dimetilamina, 1,2-diaciloxi-3-dimetilamonio propanos, cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio, 1,2-dialquiloiloxi-3-dimetilamonio propanos, dioctadecilamoglicilpermina, 3-[N-(N',N'-dimetilamino-etano)carbamoil] colesterol (DC-Col); 2,3-dioleoiloxi-N-(2-(esperminacarboxamido)-etil)-N, N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato (DOSPA), β -alanil colesterol, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), di-amidina C₁₄, N-terc-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilamino-propionamidina, cloruro de N-(alfa-trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), ditetradecanoil-N- (trimetilamonio-acetil)-dietanolamina, 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxiespermil)-propilamida (DOSPER), y yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-, yoduro de N'-bis(2-hidroxi-2-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodi-amonio, derivados de cloruro de 1-[2-(aciloxi)etil]-2-alquil(alquenoil)-3-(2-hidroxi-2-2,3-dioleoiloxi)imidazolínio, tales como cloruro de 1-[2-(9(Z)-octadecenoiloxi)etil]-2-(8(Z)-heptadecenoil-3-(2-hidroxi-2-2,3-dioleoiloxi)imidazolínio (DOTIM) y cloruro de 1-[2-(hexadecanoiloxi)etil]-2-pentadecil-3-(2-hidroxi-2-2,3-dioleoiloxi)imidazolínio (DPTIM) y derivados de 2,3-dialquiloiloxipropil amonio cuaternario que contienen un resto hidroxialquilo en la amina cuaternaria, por ejemplo, bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxi-2-2,3-dioleoiloxipropil-3-dimetil-

- 5 hidroxietil amonio (DORIE), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxiopropil amonio (DORIE-HP), bromuro de 1,2-dioleil-oxipropil-3-dimetil-hidroxiobutil amonio (DORIE-HB), bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-dimetil-hidroxiopentil amonio (DORIE-Hpe), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietyl amonio (DMRIE), bromuro de 1,2-dipalmitiloxipropil-3-dimetil-hidroxietyl amonio (DPRIE) y bromuro de 1,2-distiriloxipropil-3-dimetil-hidroxietyl amonio (DSRIE).
9. El nanolipogel de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que el lípido es un derivado PEGilado de un lípido neutro, aniónico o catiónico.
- 10 10. El nanolipogel de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el que la molécula hospedadora está polimerizada dando el polímero de la matriz polimérica.
- 15 11. El nanolipogel de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende además una molécula pequeña hidrófoba atrapada dentro de la molécula hospedadora y que opcionalmente comprende además polipéptido atrapado dentro del núcleo de la matriz polimérica.
12. El nanolipogel de la reivindicación 1 en el que la molécula hospedadora comprende ciclodextrina acrilada polimerizada dando un polímero de poliéster alifático.
- 20 13. El nanolipogel de la reivindicación 11 en el que la molécula pequeña es un inhibidor de TGF- β y el polipéptido es IL-2.
14. Un método para fabricar el nanolipogel de la reivindicación 1 que comprende mezclar la molécula hospedadora con la matriz polimérica y coextruir la mezcla polimérica con lípidos.
- 25 15. Un método para cargar el nanolipogel de la reivindicación 1 que comprende cargar uno o más primeros agentes durante la formación, y cargar uno o más segundos agentes después de la formación por el proceso de rehidratación de la matriz polimérica-molécula hospedadora en presencia del segundo agente.
- 30 16. El nanolipogel de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método terapéutico que comprende (i) implantar el nanolipogel en el sitio de un tumor resecaado o extirpado química o radioactivamente en un paciente, o (ii) insertar en el sitio de un tumor en un paciente el nanolipogel cargado con adyuvante, después de lo cual se extirpa el tumor, la matriz polimérica-molécula hospedadora absorbe los antígenos tumorales liberados y la matriz polimérica-molécula hospedadora libera los antígenos tumorales junto con el adyuvante en el cuerpo del
- 35 paciente de manera controlada.
17. Una composición farmacéutica para su uso en terapia que comprende el nanolipogel de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ciclodextrina funcionalizada para polimerización

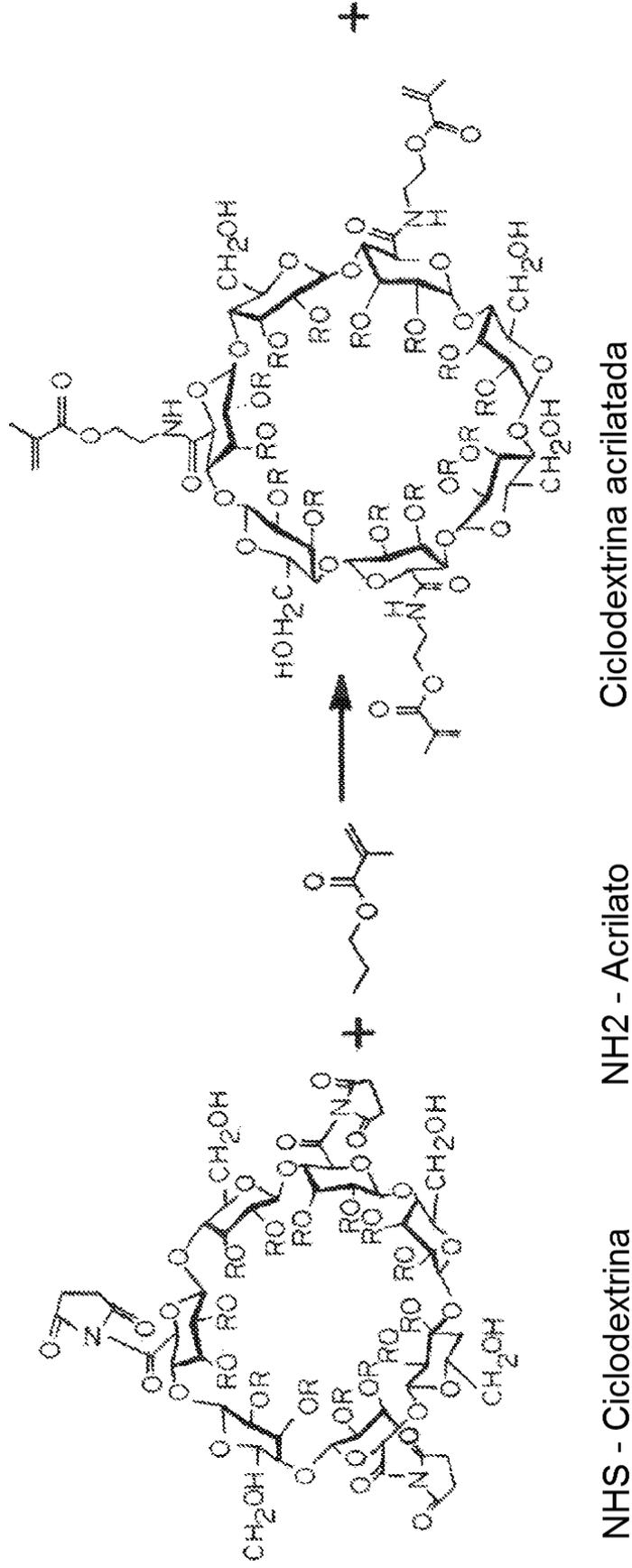


FIG. 1A

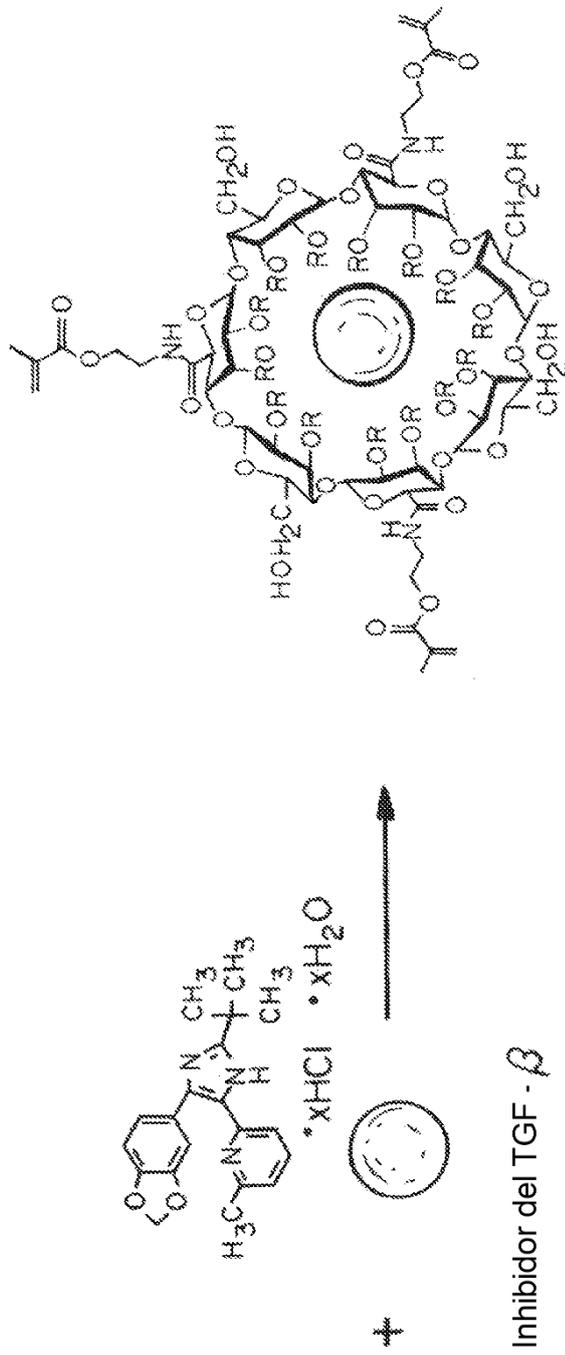


FIG. 1A continuación

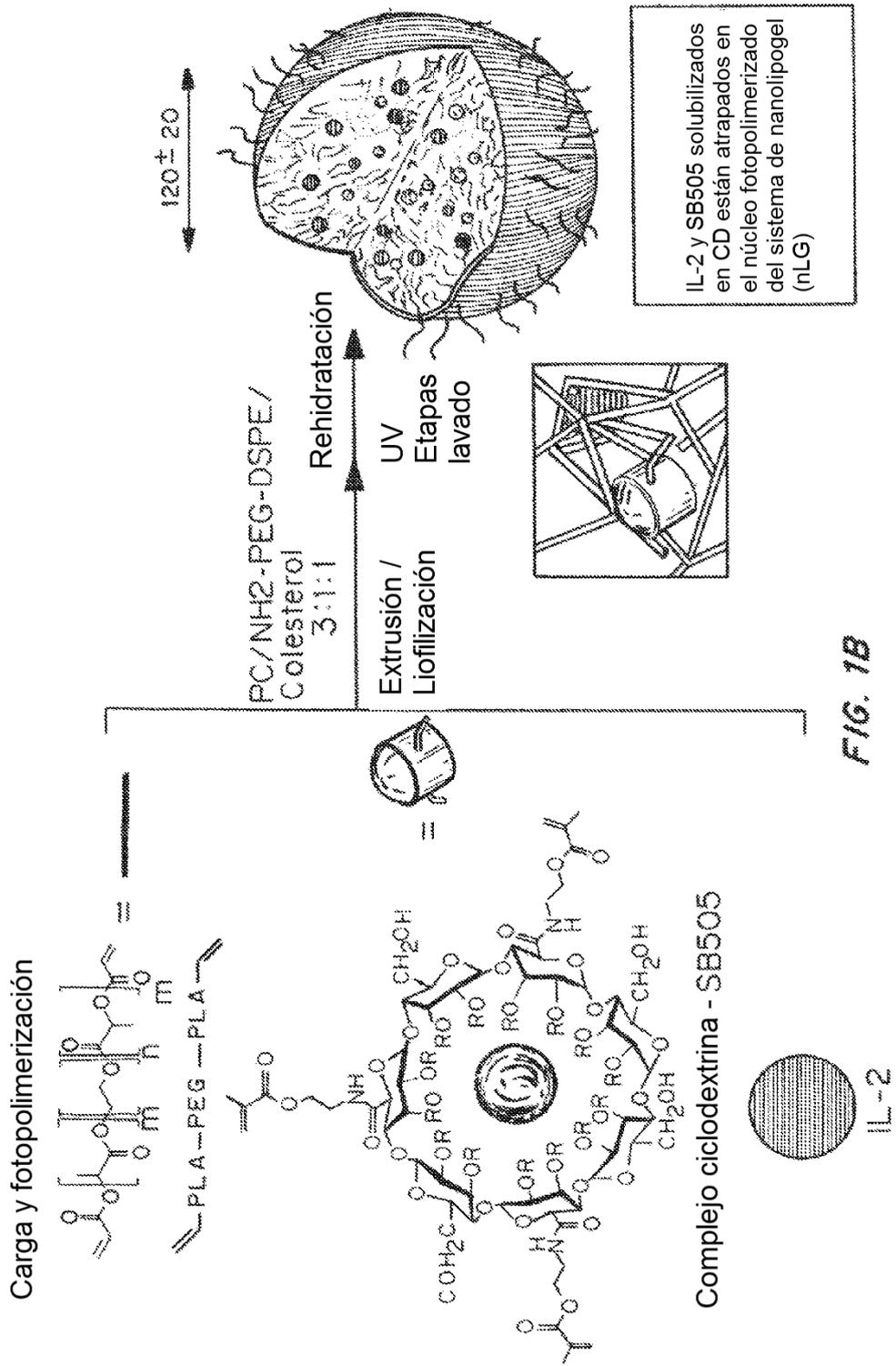
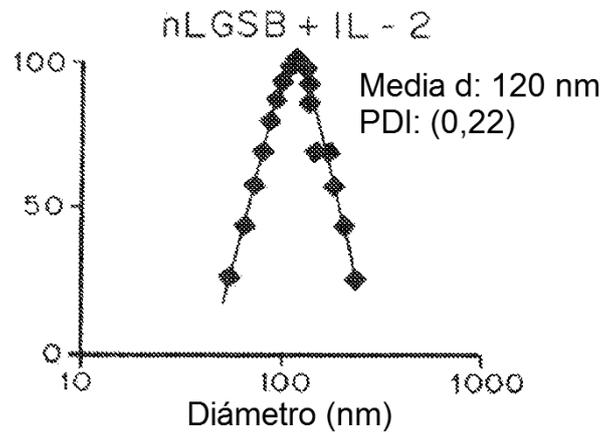
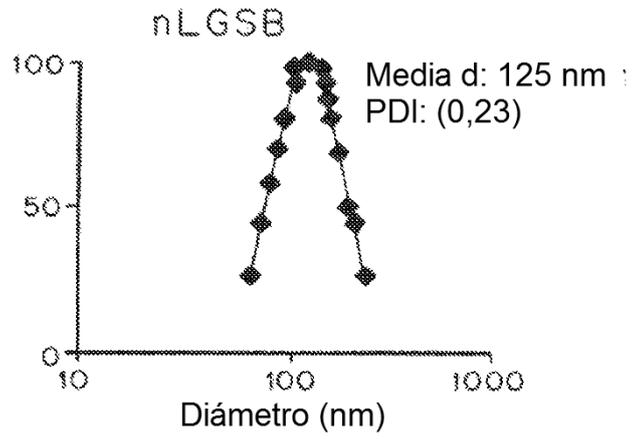
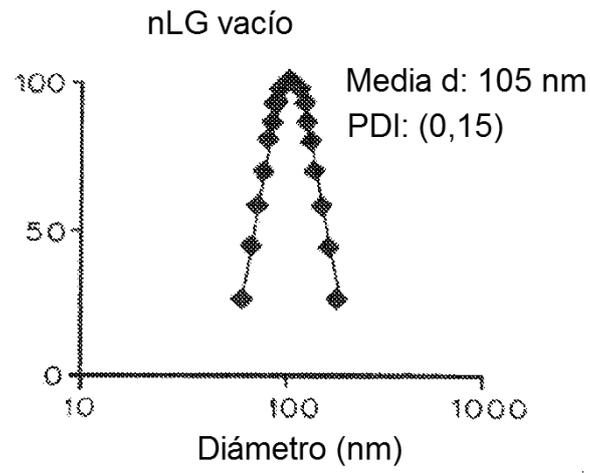


FIG. 1B



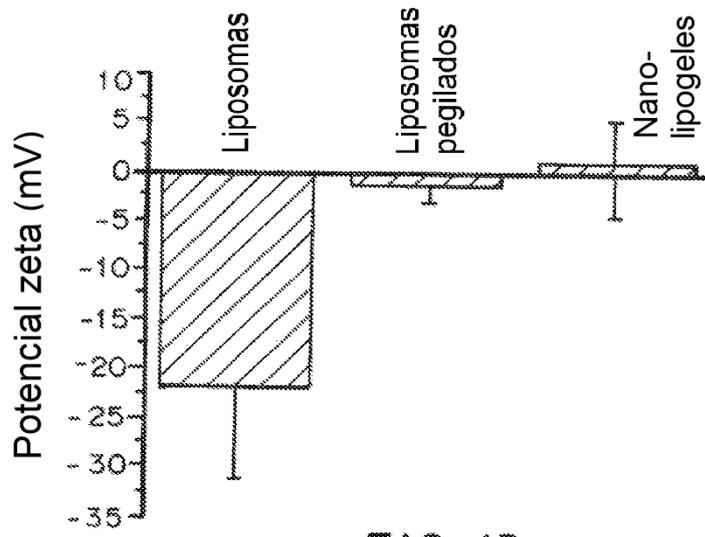


FIG. 1D

| composición de nLG (por mg de nanopartículas) | | Propiedades de la formulación de nLG |
|--|------------|--|
| Relación molar Lípidos (PC:DSPE (PEG2000)Col) 3:1:1 | | ¹ Rendimiento |
| ¹ PC | 40% ± 5% | ² Tamaño |
| ² DSPE (PEG) | 7,5% ± 2% | ³ Índice de polidispersidad |
| Colesterol | 10% ± 2 | ⁴ Eficiencia encap. (SB) |
| ³ CD | 11,3% ± 2 | ⁴ Eficiencia encap. (L-2) |
| ⁴ Polímero | 27,7% ± 3 | ⁵ Carga (SB) |
| ⁵ AEM | 3,8% ± 0,5 | ⁵ Carga (L-2) |
| ¹ Fosfatidilcolina ² 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] ³ Hidroxipropil ciclodextrano ⁴ acril - PLA - PEG(4000) - PLA - acril ⁵ Metacrilato de aminoetililo | | ¹ mg de nanopartículas/mg de lípidos ² Dispersión de luz dinámica (diámetro) ³ Basado en análisis acumulados (una estimación de la anchura de la distribución). ⁴ Carga medida/Carga máxima ⁵ Masa de fármaco en nLG /Masa de nLG |

FIG. 1E

FIG. 1F

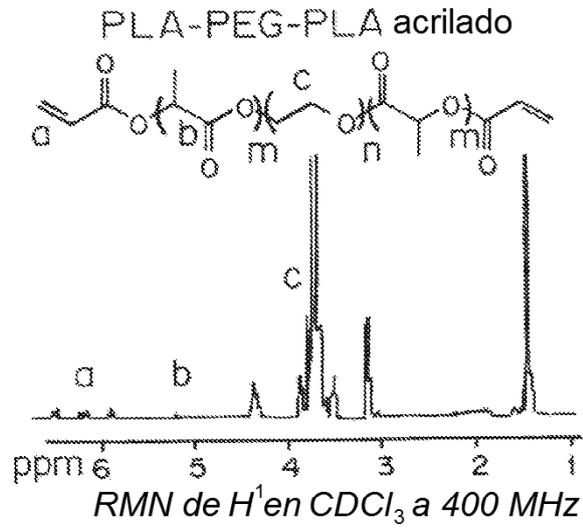
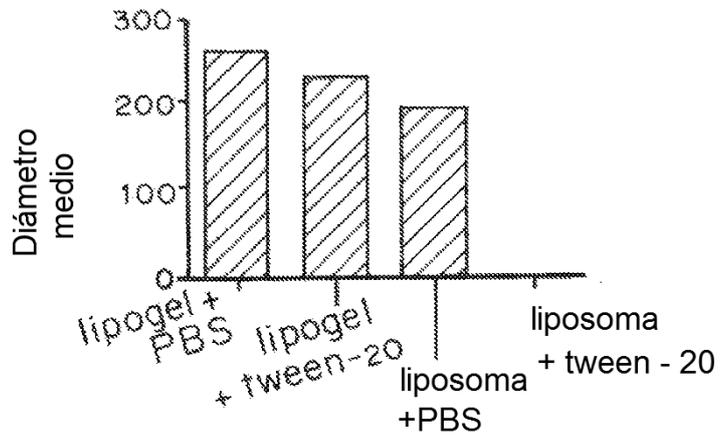


FIG. 1G



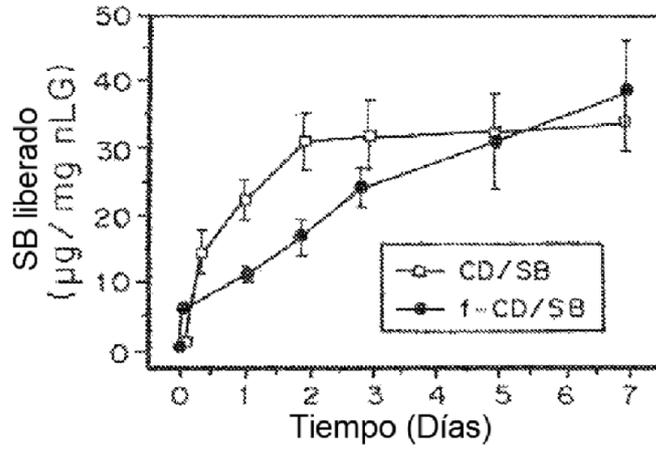


FIG. 2A

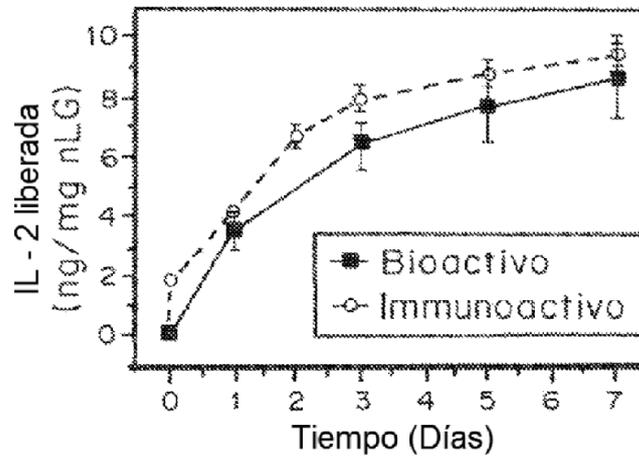


FIG. 2B

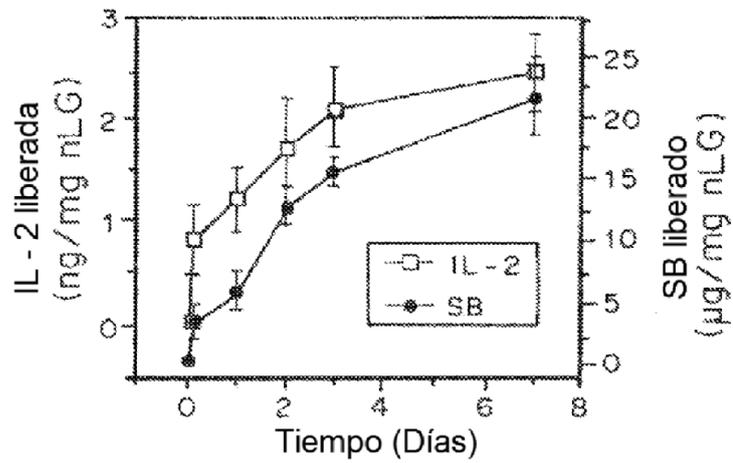


FIG. 2C

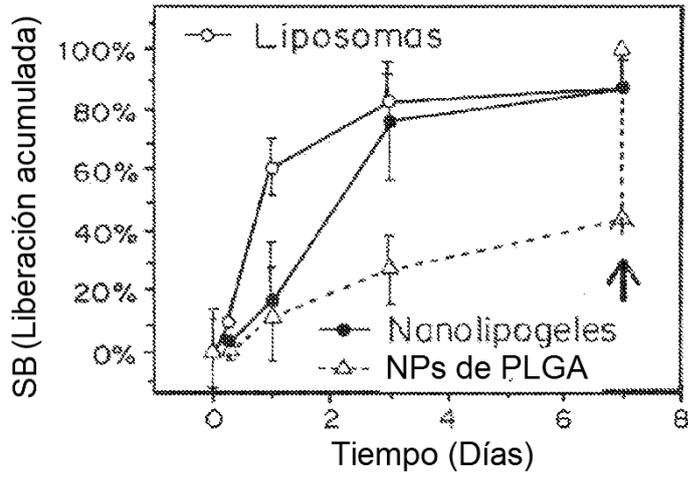


FIG. 2D

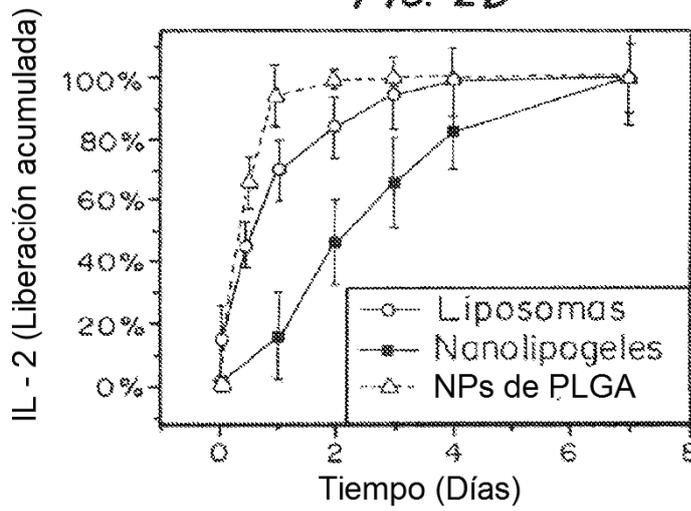


FIG. 2E

| | Tamaño (nm) | Carga * | |
|----------|-------------|--------------|------------|
| | | IL-2 (ng/mg) | SB (ug/mg) |
| PLGA | 150 ± 50 | 1 ± 2 | 20 ± 10 |
| nLG | 120 ± 20 | 10 ± 2 | 40 ± 10 |
| Liposoma | 100 ± 20 | 35 ± 15 | 3 ± 2 |

* masa de fármaco en partícula/masa de partícula

FIG. 2F

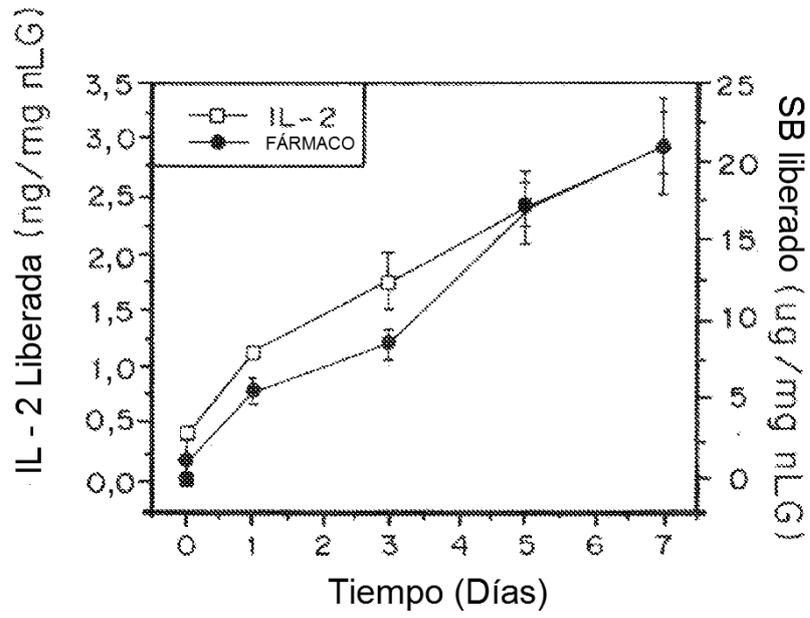


FIG. 3A

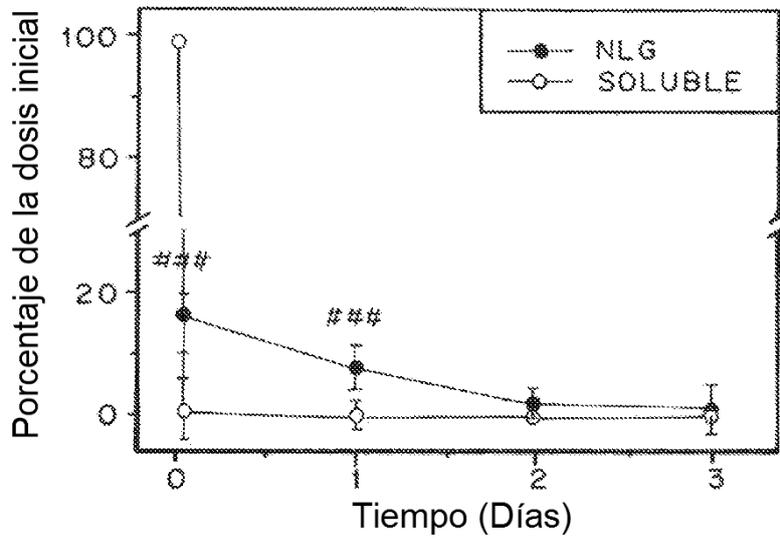


FIG. 3B

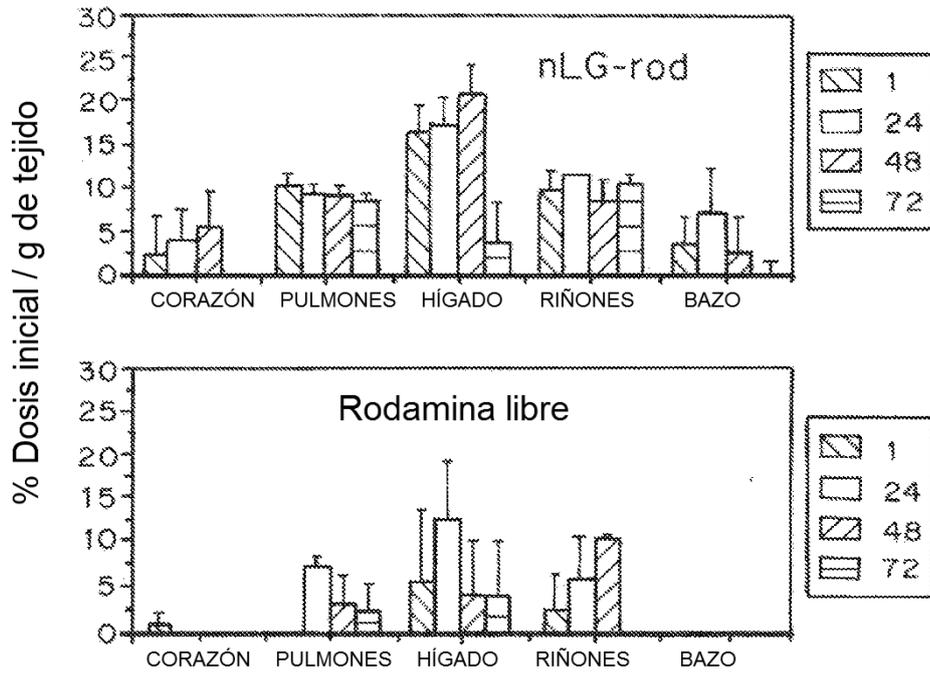


FIG. 3C

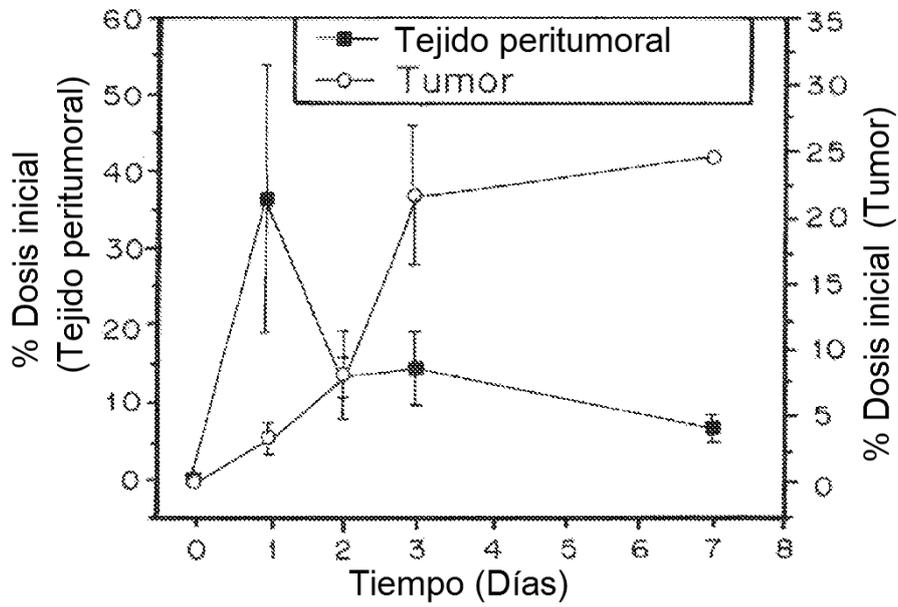


FIG. 3D

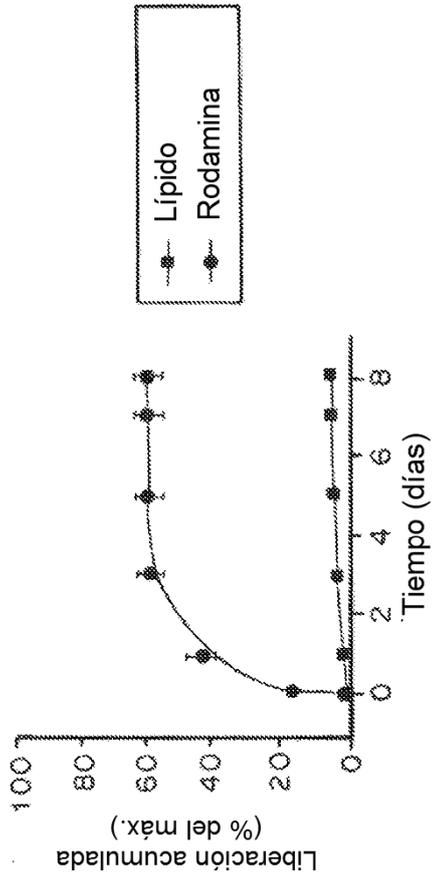


FIG. 3E

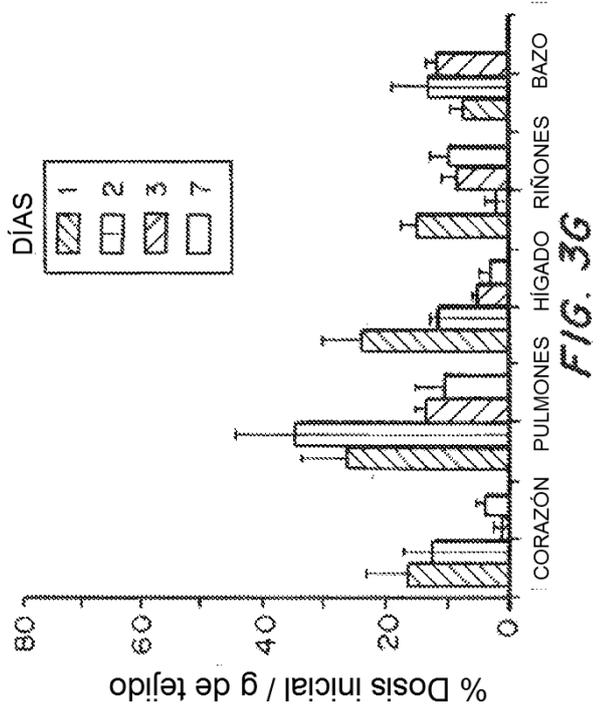


FIG. 3F

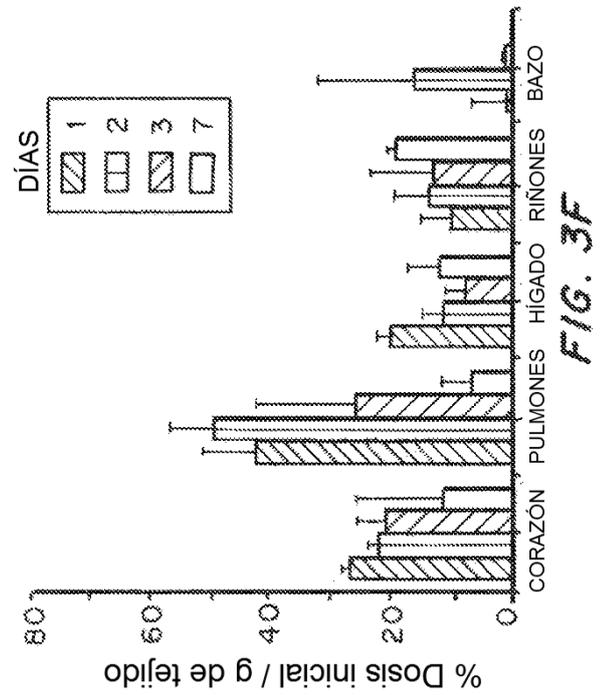


FIG. 3F

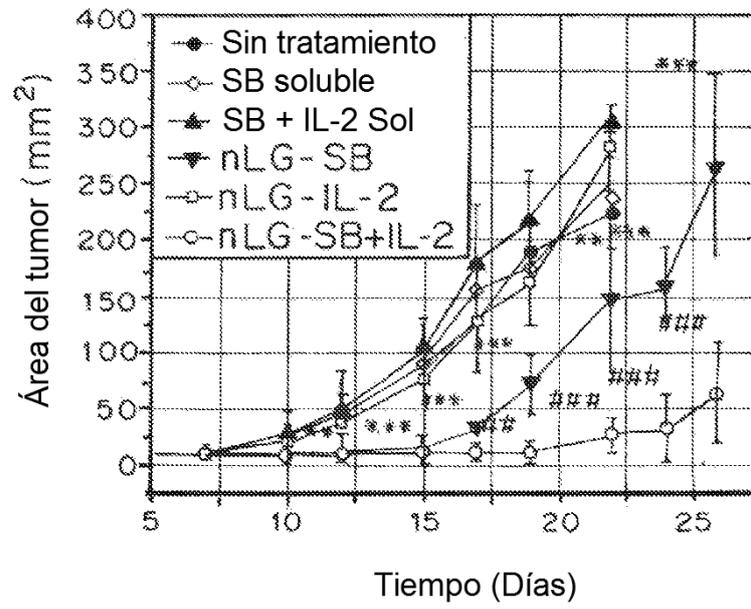


FIG. 4A

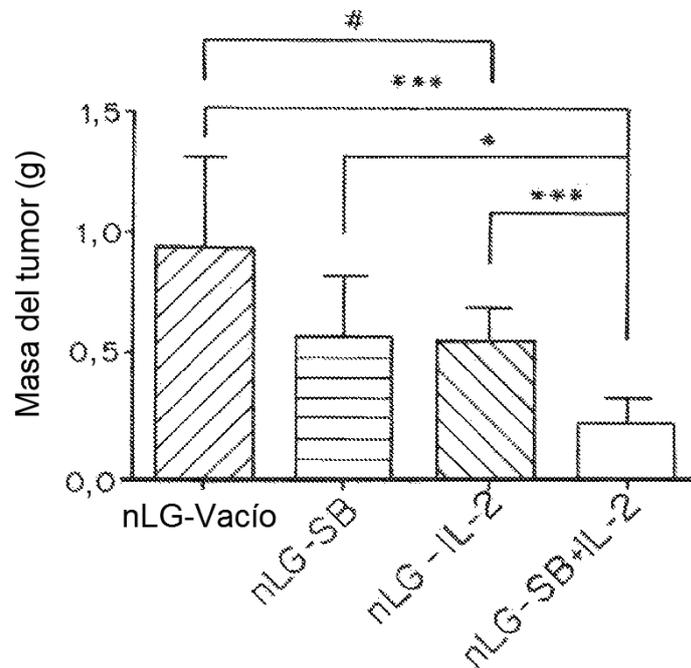


FIG. 4B

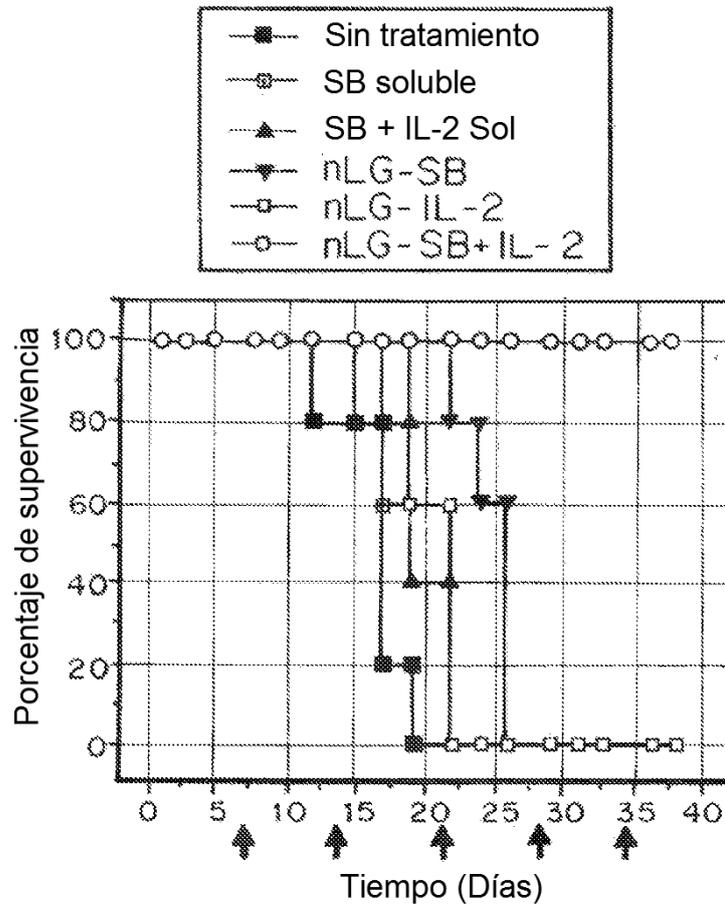


FIG. 4C

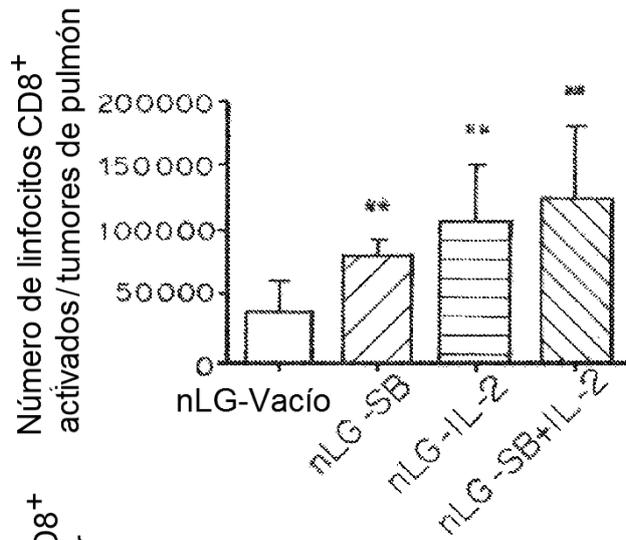


FIG. 5A

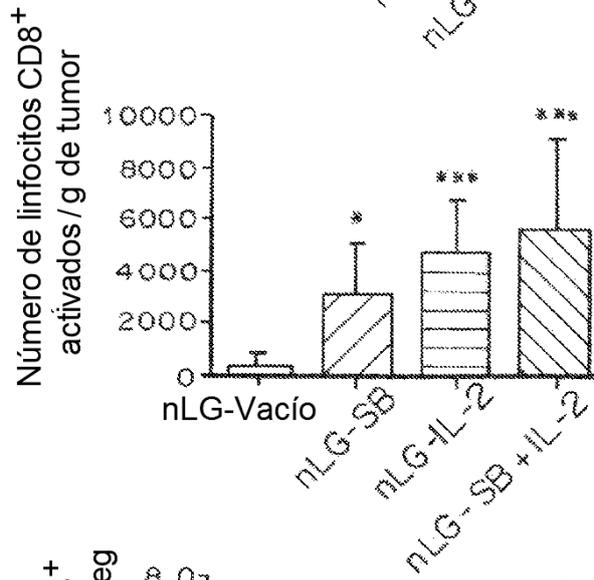


FIG. 5B

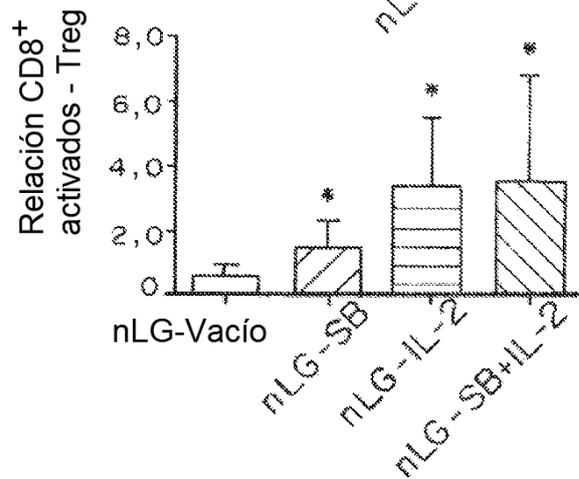


FIG. 5C

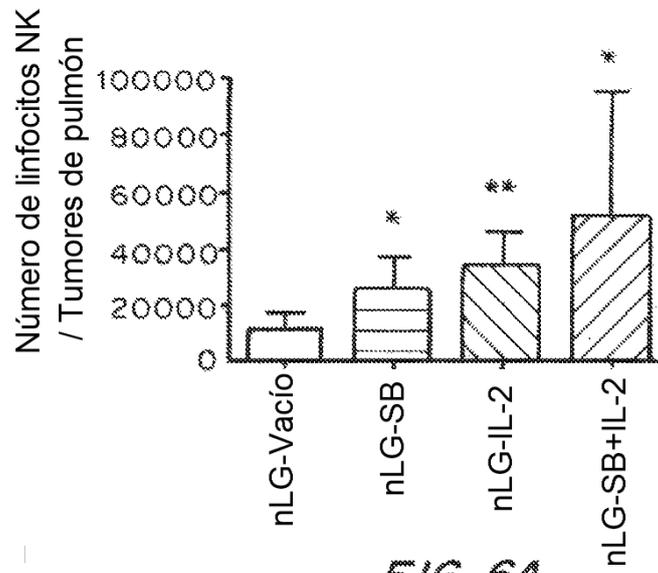


FIG. 6A

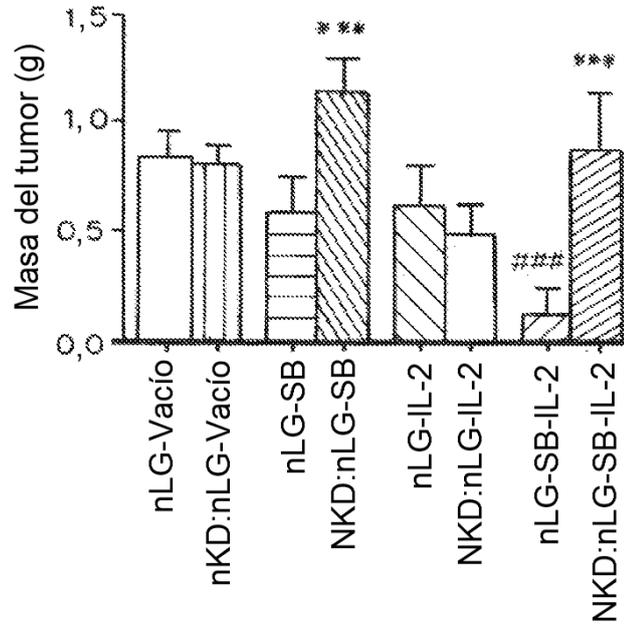


FIG. 6B

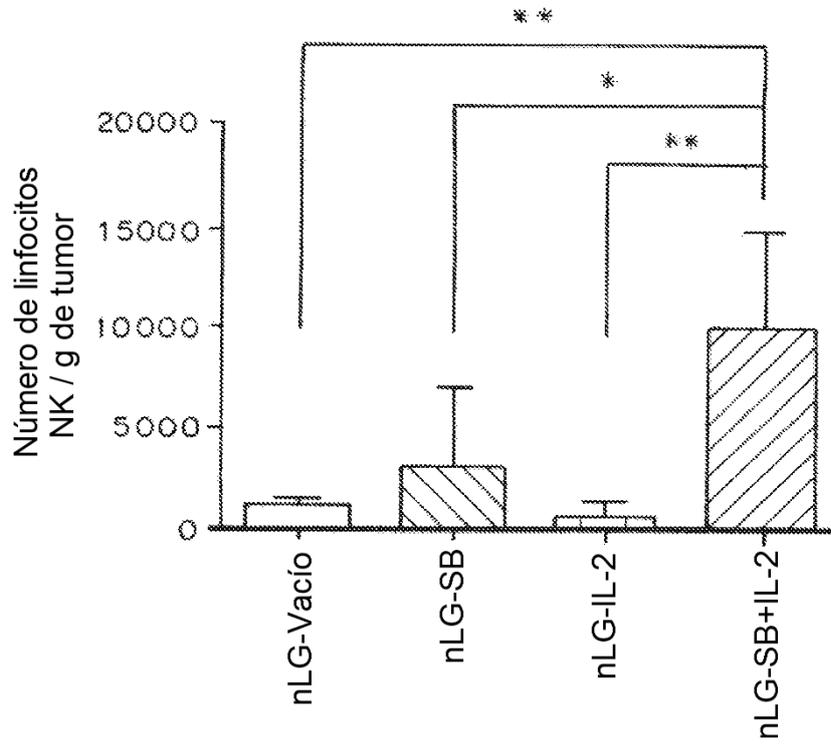
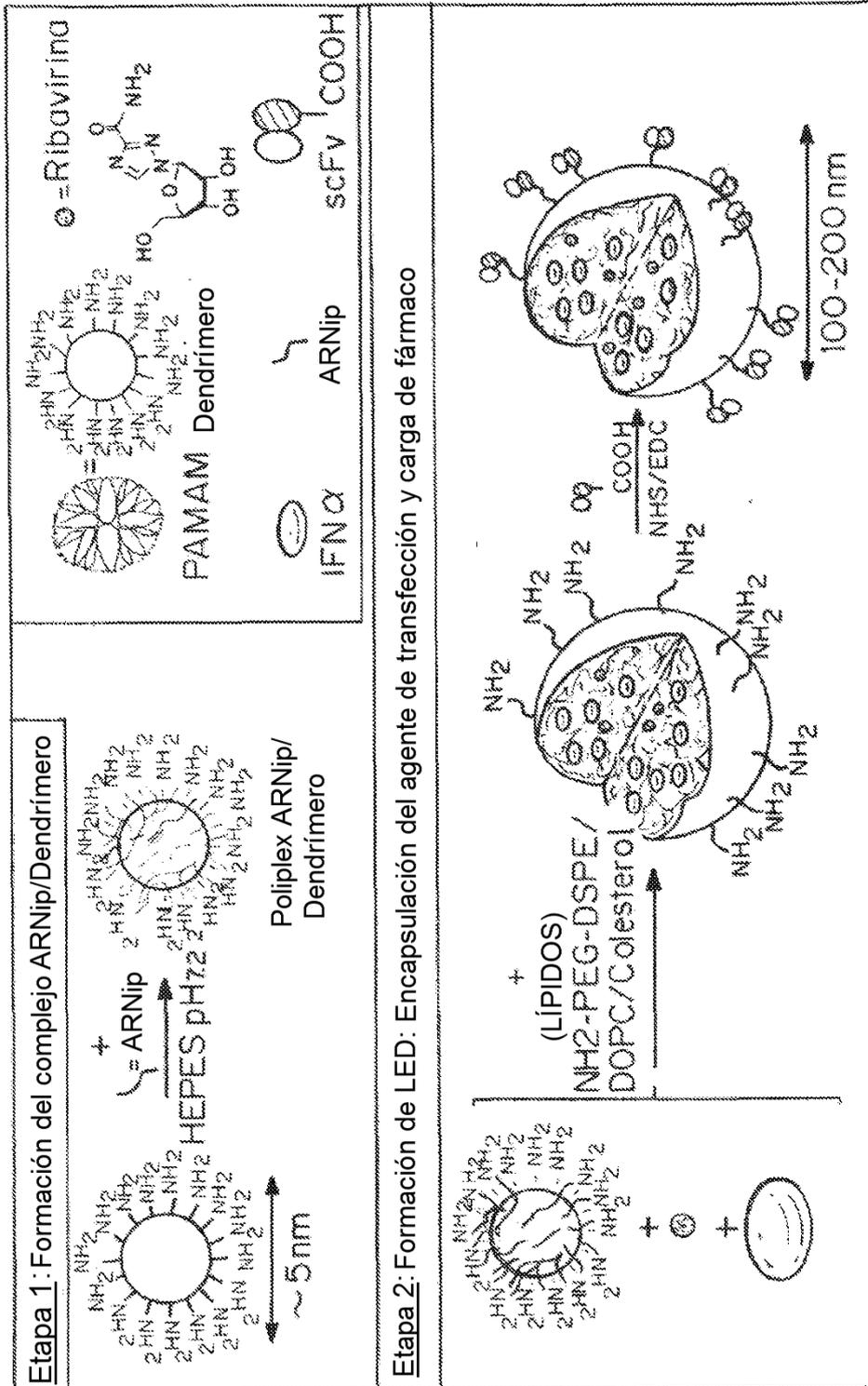


FIG. 6C



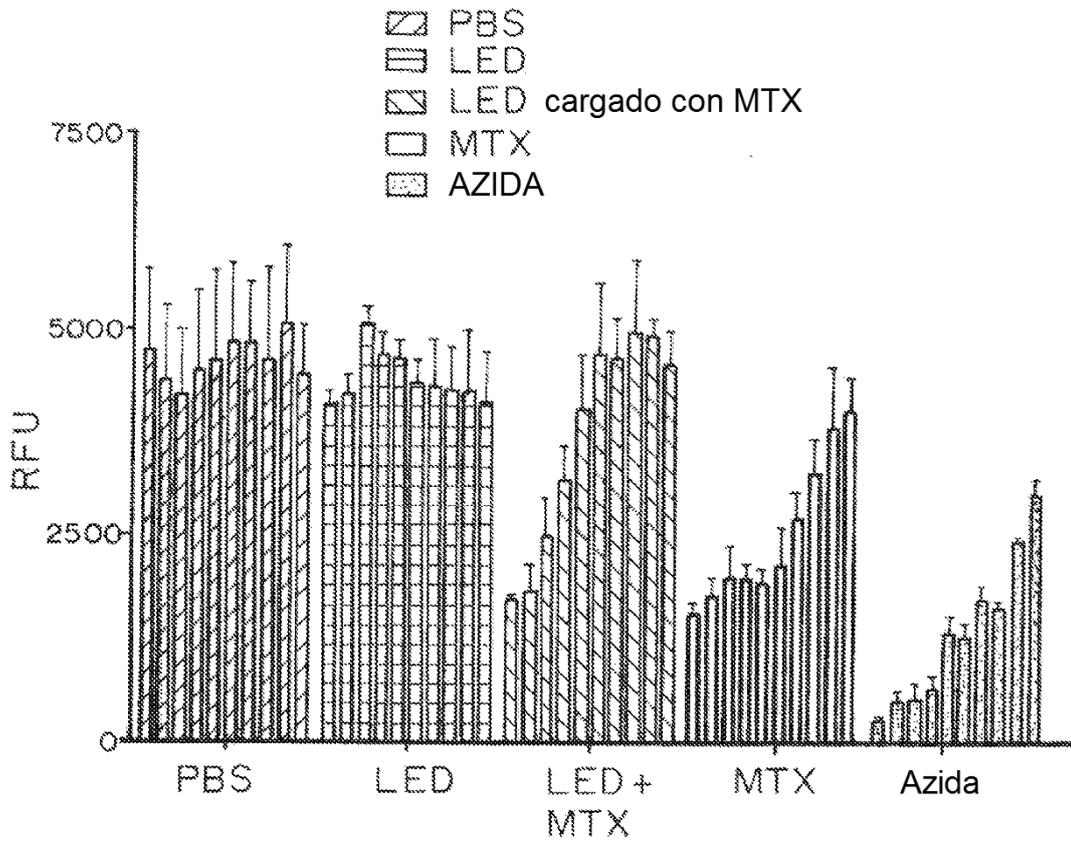


FIG. 7B

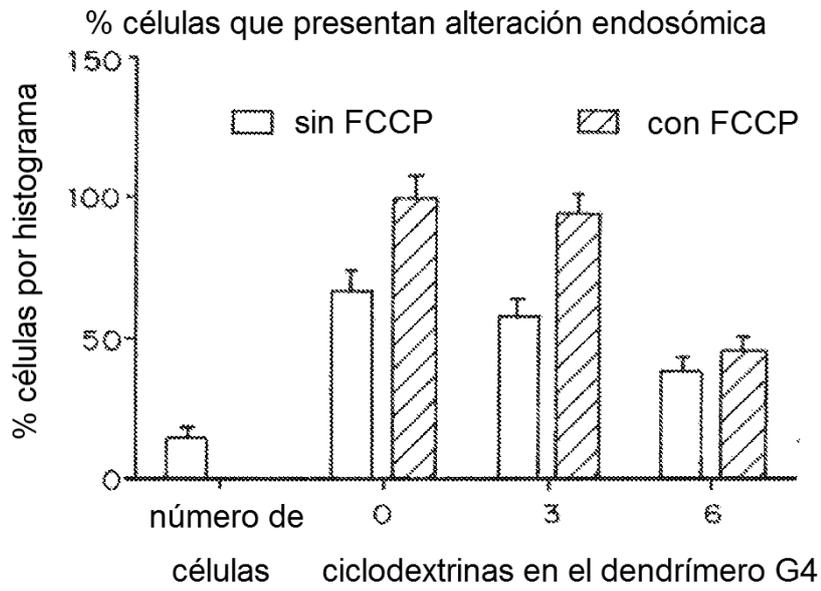


FIG. 7C

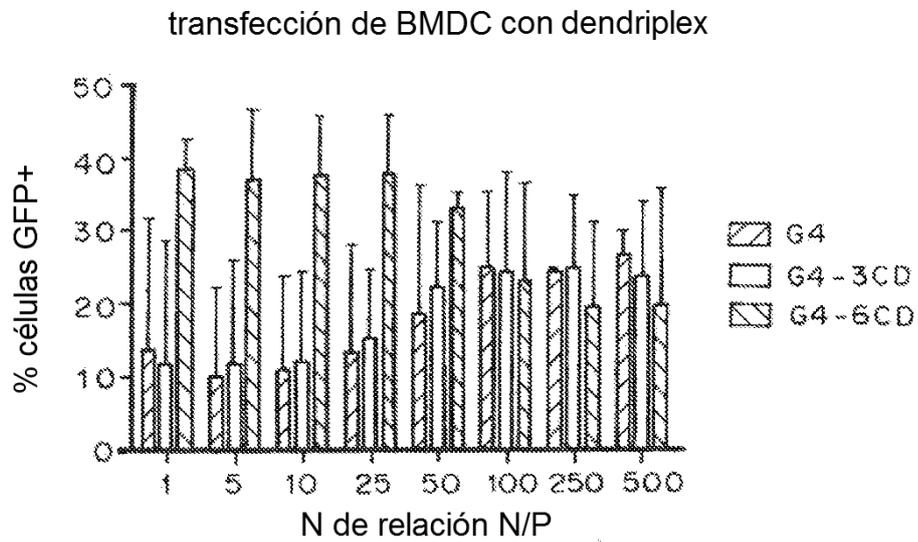


FIG. 7D

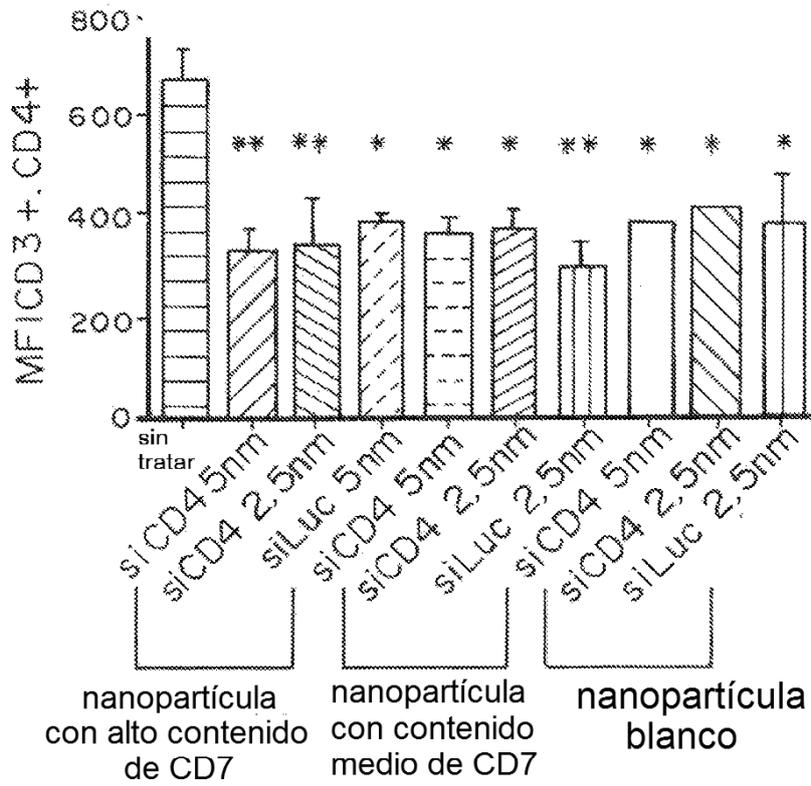


FIG. 7E

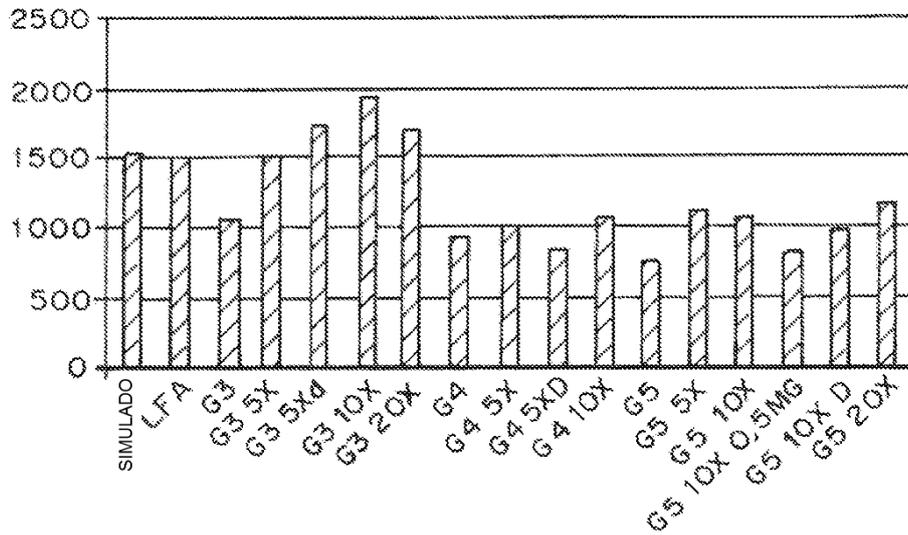


FIG. 7F

Presentación cruzada en BMDC por liposomas

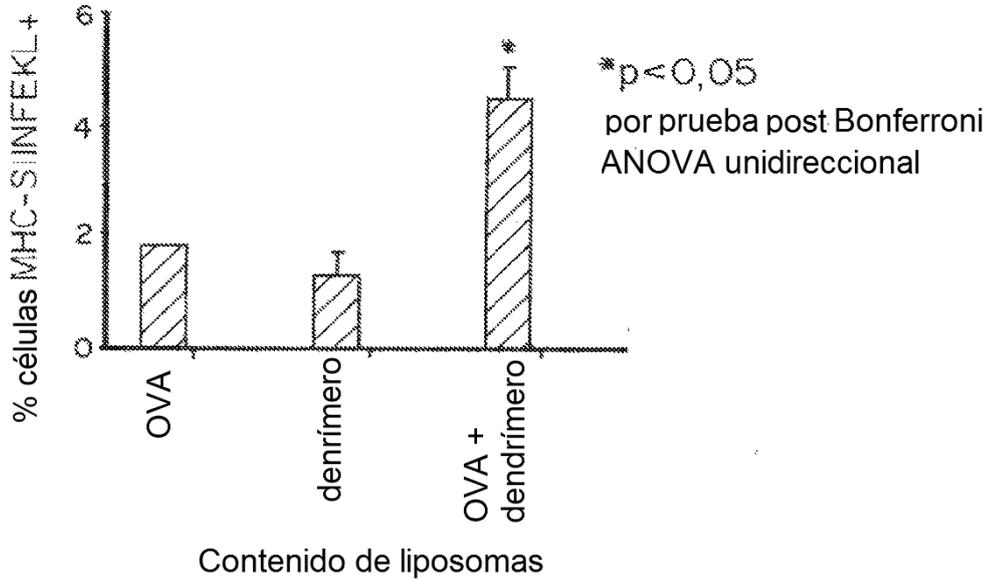


FIG. 8A

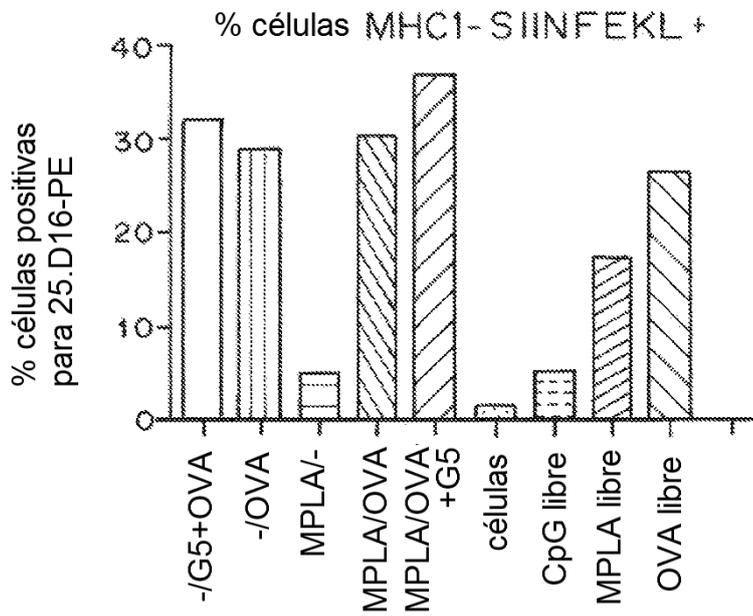


FIG. 8B

IL-6 de BMDC 24 horas

- nanopartículas de PLGA
- ▨ liposoma

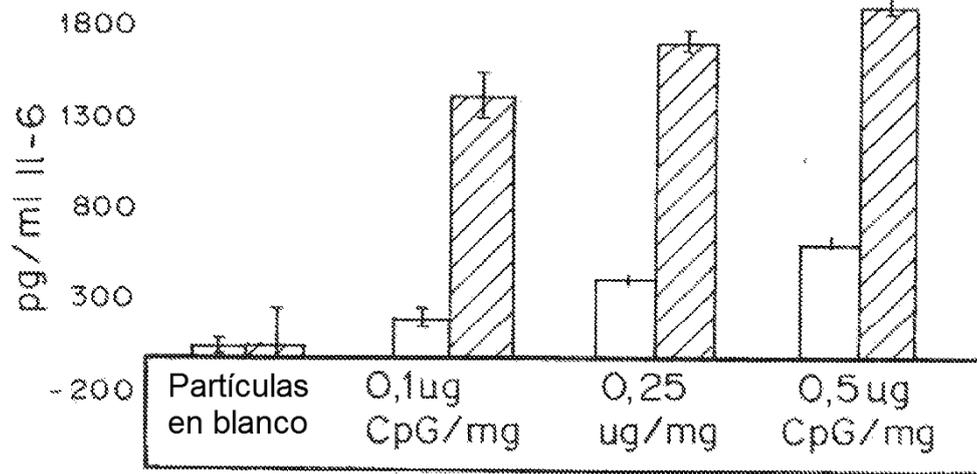


FIG. 8C