

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 025**

21 Número de solicitud: 202330581

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.07.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.03.2024

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN BIOSANITARIA DEL PRINCIPADO
DE ASTURIAS (FINBA) (60.0%)**
Avda. del Hospital Universitario, s/n
33011 Oviedo (Asturias) ES y
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(40.0%)**

72 Inventor/es:

FILICE, Marco;
LOZANO CHAMIZO, Laura;
SUÁREZ ÁLVAREZ, Beatriz;
LÓPEZ LARREA, Carlos y
SÁIZ ÁLVAREZ, M^a Laura

54 Título: **Nanoformulaciones lipídicas de inhibidores BET para el tratamiento del daño renal**

57 Resumen:

Nanoformulaciones lipídicas de inhibidores BET para el tratamiento del daño renal.

En situaciones de daño renal agudo y crónico pueden utilizarse inhibidores BET (Bromodomain and Extra Terminal domain), como la molécula JQ1, para inhibir la ruta UPR (Unfolded Protein Response) y otras rutas inflamatorias y pro-fibróticas, haciendo que mejore el daño tisular y se recupere la función renal. Sin embargo, JQ1 presenta toxicidad y baja especificidad por lo que, para conseguir un efecto terapéutico adecuado, es necesario utilizar altas dosis que son incompatibles con un bajo grado de toxicidad.

En la presente invención se propone una solución al pobre perfil farmacocinético de JQ1 y su baja disponibilidad oral que consiste en el diseño y desarrollo de nanopartículas de base lipídica que permiten encapsular y administrar de forma selectiva el inhibidor JQ1 en cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado y, al mismo tiempo, disminuir su toxicidad.

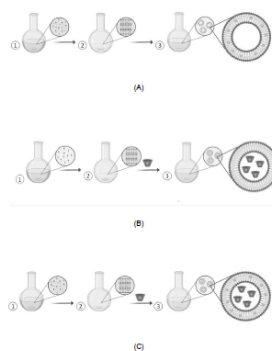


Figura 1

ES 2 963 025 A1

DESCRIPCIÓN

Nanoformulaciones lipídicas de inhibidores BET para el tratamiento del daño renal

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de las formulaciones de liposomas para uso médico. De forma más concreta, la invención describe nanoformulaciones lipídicas para uso en el tratamiento del daño renal.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La lesión renal aguda (LRA) se define como una condición patológica caracterizada por la disminución abrupta de la tasa de filtración glomerular (TFG) y está asociada con un mayor riesgo de progresión a enfermedad renal crónica (ERC) en los pacientes supervivientes, debido a la generación de mecanismos desadaptativos en el riñón. Se cree que la reparación maladaptativa está impulsada por una combinación de factores que incluyen la inflamación persistente, el estrés oxidativo y vías de señalización desreguladas que pueden contribuir a la disminución progresiva de la función renal que se observa en la ERC.

20

Aunque todavía no existen terapias aprobadas para tratar la LRA ni para reducir sus secuelas, sí se ha descubierto que la epigenética es clave para regular la patogénesis. La epigenética se refiere a cambios reversibles y hereditarios en la expresión génica, que no implican alteraciones en la propia secuencia de ADN original. En este sentido, la familia de proteínas con bromodominios (BRD) y dominio extraterminal (BET), que comprende las proteínas BRD2, BRD3 y BDR4 y la proteína con bromodominios específica de testículo (BRDT), son “lectores” epigénéticos, cuya función consiste en detectar histonas acetiladas a través de su bromodominio y reclutar la maquinaria de elongación de la transcripción para inducir el inicio y la extensión de la transcripción.

30

El desarrollo de moléculas pequeñas inhibidoras de bromodominios ha permitido dilucidar su rol en relación con alteraciones del acetiloma en diferentes enfermedades. Esto los ha situado como agentes importantes en la biología del cáncer y en la inflamación.

35

En el caso concreto del daño renal agudo y crónico, como consecuencia de una insuficiencia renal o trasplante renal, la ruta de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*) se encuentra desregulada, lo cual da lugar a un aumento de la expresión de genes inflamatorios y apoptóticos. Para evitar esta situación, puede utilizarse la molécula JQ1, que es un inhibidor específico de proteínas BET que actúa inhibiendo la ruta UPR y otras rutas inflamatorias, haciendo que mejore el daño tisular y se recupere la función renal (Morgado Pascual, J.L. et al. *Bromodomain and Extraterminal Proteins as Novel Epigenetic Targets for Renal Diseases*. Front. Pharmacol. 2019; 10: 1315).

Sin embargo, JQ1 presenta toxicidad por lo que, para conseguir un efecto terapéutico adecuado, es necesario utilizar dosis altas que son incompatibles con un grado de toxicidad bajo. Para solventar este inconveniente, se han llevado a cabo trabajos donde JQ1 se combina con otros inhibidores y se administra mediante liposomas (WO2016061144) para una variedad de aplicaciones como tratamiento de tumores (CN114053223A) o para reducir, inhibir y/o prevenir las respuestas celulares agudas que conducen a la futura degradación del cartílago y la osteoartritis.

En la presente invención se propone una solución al insuficiente perfil farmacocinético de JQ1 y su baja biodisponibilidad oral y que consiste en el diseño y desarrollo de una serie de nanopartículas de base lipídica que permiten encapsular y administrar de forma selectiva el inhibidor JQ1, en cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado y, al mismo tiempo, disminuir su toxicidad.

25

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La invención describe un nuevo enfoque en el diseño y desarrollo de nanopartículas de base lipídica que contienen el inhibidor JQ1 basándose en la aplicación de técnicas de nanobioteología. Debido a su potencial traslacional, su versatilidad sintética y su biodisponibilidad, para la encapsulación del fármaco JQ1 se diseñan y validan *in vitro* e *in vivo* una serie de nanopartículas lipídicas. Una formulación farmacéutica basada en estas nanopartículas lipídicas es útil en el tratamiento de la patología renal (aguda y crónica), generada por un daño o tras un trasplante renal, y en el seguimiento por imagen de su biodistribución.

35

Por cada tipología de nanopartícula sintetizada se lleva a cabo una intensa caracterización de propiedades fisicoquímicas y se *evalúa el efecto terapéutico in vitro*
 5 e *in vivo*, así como su capacidad de promover imagen molecular *in vivo* por fluorescencia tras su administración sistémica.

Las nanopartículas liposomales conteniendo JQ1 obtenidas (NPs-JQ1) y objeto de esta invención presentan una notable especificidad hacia la zona a tratar (en este caso, los
 10 riñones sometidos a daño mediante isquemia). Además, estas nanopartículas permiten promover imagen molecular dual por técnicas de fluorescencia y resonancia magnética. Consecuentemente, al aunar actividad terapéutica y potencialmente diagnóstica en una única entidad, estas nanopartículas pueden permitir la teragnosis (terapia + diagnosis) del daño renal causado por una isquemia.

15 Diferentes estrategias de encapsulación se combinan con múltiples condiciones de síntesis (tipo de lípidos, proporción de los mismos, ratio lípido:fármaco o adición de aditivos específicos, por ejemplo). Las estrategias de encapsulación utilizadas son: (a) la encapsulación de JQ1 en la membrana de los liposomas, (b) la encapsulación de JQ1
 20 en los núcleos hidrofílicos de los liposomas y (c) la doble encapsulación (JQ1 presente tanto en la membrana como en el núcleo de los liposomas).

La encapsulación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el método de hidratación de película lipídica delgada, que comprende:

- 25 - Preparar una disolución conteniendo lípidos
- Preparar una disolución de JQ1
- Mezclar las disoluciones anteriores
- Evaporar los disolventes para obtener una película delgada
- Hidratar la película delgada con agua destilada
- 30 - Promover el levantamiento de la película delgada con la solución de hidratación y fomentar la formación de las nanopartículas lipídicas.

Los lípidos utilizados en la presente invención son disueltos en solventes orgánicos volátiles convencionales según su naturaleza química. El inhibidor JQ1 se disuelve en
 35 un disolvente orgánico como el acetonitrilo que tiene que ser miscible tanto en la fase

orgánica como en la fase acuosa según se encapsule dentro del núcleo del liposoma o en su membrana fosfolipídica. Se pueden añadir aditivos (como colesterol, por ejemplo) para mejorar la eficacia de la encapsulación.

- 5 En el caso de la encapsulación en el núcleo (liposomas tipo II) o en la encapsulación dual, en el núcleo y membrana de los liposomas (liposomas tipo III), se prepara también una disolución de JQ1 para crear un complejo con agentes complejantes para aumentar la solubilidad acuosa de sustancias activas poco solubles en agua, con el fin de
- 10 que el fármaco se solvate dentro del núcleo acuoso del liposoma, se ha usado, por ejemplo, la beta-ciclodextrina, siendo posible el uso de otras tipologías de ciclodextrinas

Las nanopartículas de base lipídica que contienen el inhibidor JQ1 obtenidas, se caracterizan porque el inhibidor JQ1 se encuentra encapsulado en liposomas con una

15 mezcla de lípidos de cadena C₁₄ a C₁₈, en una proporción JQ1:lípidos comprendida entre 1:30 y 1:100 (p/p).

Por cada tipología de partícula sintetizada se lleva a cabo una extensa caracterización de las propiedades físico-químicas y se evalúa el efecto terapéutico, *in vitro* e *in vivo*.

20

La estrategia sintética propuesta puede ser aplicada a otros fármacos inhibidores de la misma familia BET, así como a otros fármacos que actúan sobre dianas moleculares distintas pero con la misma finalidad (tratamiento del daño renal agudo).

- 25 La presencia de gadolinio en la composición lipídica da lugar a nanopartículas cuya relaxividad permite esperar su potencial aplicación como agentes de contraste moleculares en resonancia magnética. La presencia simultánea de un fluoróforo en la composición lipídica da lugar a nanopartículas que pueden utilizarse en imagen de fluorescencia. Así, se pueden utilizar como agentes duales en imagen molecular
- 30 multimodal MRI/OI.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1.** Representación esquemática de la preparación de nanopartículas liposomales
- 35 conteniendo JQ1: (A) liposomas Tipo I, (B) liposomas Tipo II y (C) liposomas Tipo III.

Figura 2. Caracterización fisicoquímica de liposomas duales JQ1: a) Radio hidrodinámico; b) Micrografía TEM; c) Punto isoeléctrico.

5 **Figura 3.** Análisis de las propiedades de imagen molecular y relaxividad. a) Mapa T_1 de diferentes concentraciones de NPs-JQ1 en imagen de resonancia magnética nuclear. b) Imagen de fluorescencia de diferentes concentraciones de NPs-JQ1. c) Análisis de los tiempos de relajación T_1 y T_2 basados en la concentración de gadolinio.

10 **Figura 4.** Determinación de la viabilidad de células HK-2 utilizando el ensayo MTT.

Figura 5. Análisis de la viabilidad celular de HK-2 utilizando el ensayo Anexina V/7AAD. Apoptosis temprana (Anexina V + y 7AAD -) y apoptosis tardía o necrosis (Anexina V + y 7AAD +)

15

Figura 6. Eficacia *in vitro* de nanopartículas cargadas con JQ1: (A) Histogramas representativos de citometría de flujo; (B) Intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células tratadas con RdR-NP y no tratadas junto con el porcentaje de células positivas, en diferentes tiempos; y (C, D). niveles de expresión génica de IL6 y CCL2 analizados mediante qPCR en células HK-2 tratadas con NP vacías (NP sin JQ1), NPs-JQ1, JQ1(+) o JQ1 (-) durante 24 horas y estimulación con $TNF-\alpha$ (10 ng/ml) durante las últimas 3 horas.

25 **Figura 7.** Evaluación de biodistribución *in vivo* de NP marcadas con fluorescencia: a) señal de fluorescencia capturada en ratones completos desde las posiciones dorsal y ventral para ratones operados de forma simulada (SIM) y ratones isquémicos (I/R); b) imágenes *ex vivo* de órganos aislados obtenidos de SIM o I/R a las 24 h de la inyección con NP; c) análisis cuantitativo de la acumulación en los órganos aislados; y d) promedio de porcentaje de eficiencia (fotones emitidos por las muestras por unidad de tiempo y superficie).

35 **Figura 8.** Tratamiento de ratones con NPs-JQ1 después de bIRI: a) niveles de proteína NGAL mediante ensayo de *Western Blot* (WB); b) niveles de expresión del gen NGAL mediante qPCR; c) niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN, mg/dl); y d) creatinina sérica (mg/dl) evaluados en ratones a las 24 h de daño post-isquémicos en ratones

administrados con 20, 30 y 40 mg/kg de NPs-JQ1.

Figura 9. Eficacia de la administración de JQ1 mediante liposomas en comparación con su estado no encapsulado: a) niveles de proteína NGAL medidos mediante WB después de la administración de vehículo β -ciclodextrina y JQ1 encapsulado utilizando como vehículo β -ciclodextrina (β -actina como proteína control); b) niveles de expresión NGAL por qPCR; c) secciones teñidas con PAS para animales simulados e isquémicos tratados con NP sin JQ1, con NPs-JQ1 y JQ1 sin encapsular para una dosis de 40 mg/kg; d) nitrógeno ureico en sangre (BUN, mg/dl); y e) creatinina sérica (mg/dl).

10

Figura 10. Disminuida toxicidad hepática tras la encapsulación de JQ1 en nanopartículas: (A) análisis de marcadores séricos hepáticos y (B) evaluación histológica del hígado.

15 **Figura 11.** Cambio en el peso corporal de los ratos tratados con NPs-JQ1 en los primeros 14 días después de la administración de 40 mg/kg.

Figura 12. Supresión de la respuesta inflamatoria en el riñón tras el tratamiento con NPs-JQ1: a) expresión de genes de citoquinas proinflamatorias medidas por qPCR en muestras de riñón de diferentes grupos de ratones a las 24 horas posteriores a la reperusión; b y c) diagrama de puntos representativos de citometría de flujo de la infiltración de células de neutrófilos (parte izquierda) y monocitos (parte derecha) dentro de los riñones de los ratones; d) cuantificación del número total de células por riñón de neutrófilos y monocitos en la población CD45+.

25

Figura 13. Prevención con NPs-JQ1 de la fibrosis renal tras bIRI: a) análisis cuantitativos por qPCR de la expresión de genes relacionados con la fibrosis; b) niveles de proteína medidos mediante WB de α -SMA y Fibronectina-1 (β -actina como proteína de control) y por qPCR; c) Imágenes representativas de la tinción con tricrómico de Masson a día 21, de riñones isquémicos tratados como se indica y cuantificación (%) del área teñida; d) niveles del marcador de daño renal NGAL por qPCR; y e) nitrógeno ureico en sangre (BUN, mg/dl).

35

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretender ser limitativos de su alcance.

5

Ejemplo 1. Síntesis de nanopartículas de base lipídica.

Se optimizan tres formulaciones de liposomas, cuyo esquema se representa en Figura 1: liposomas con JQ1 encapsulado en membrana (tipo I); liposomas con JQ1
10 encapsulado en el núcleo (tipo II); y liposomas con encapsulación dual, tanto en la membrana como en el núcleo (tipo III).

En todos los casos, los liposomas se sintetizan mediante el método de hidratación de película delgada de lípidos.

15

De forma general, para ello, en primer lugar, se preparan soluciones madre de lípidos, disolviendo DMPC a 10 mg/ml en cloroformo y disolviendo MHPC y Gd-DTPA-BSA a 10 mg/ml en una mezcla cloroformo:metanol (3:1 v/v).

20 Por otro lado, se disuelve JQ1 en acetonitrilo en una concentración de 5 mg/ml.

Posteriormente, se mezclan estas soluciones en la proporción adecuada para conseguir la composición de liposomas deseada. En este caso, se mezclan los lípidos DMPC, MHPC y Gd-DTPA-BSA en una relación molar 7,6:1,1:1 y se añade JQ1 en acetonitrilo
25 en una relación en una relación en peso 1:30 con la cantidad total de lípidos.

Para la encapsulación de JQ1 en el núcleo del liposoma (liposomas tipo II) se produce además un complejo CD-JQ1 al 1% en agua con 5 mg/ml de JQ1 en acetonitrilo, en una relación de volumen CD:JQ1 de 9:1 permitiendo que el fármaco se solvate dentro del
30 núcleo acuoso del liposoma. Se logra un rendimiento de encapsulación del 50%.

La encapsulación de JQ1 tanto en la membrana como en el núcleo del liposoma (liposomas tipo III) se realiza encapsulando un total del 50% de JQ1 tanto en la membrana como en el núcleo.

35

La disolución acuosa de hidratación se agrega en una proporción de 1 ml de agua por 2,5 mg de lípidos. En la Figura 1 se esquematiza en proceso de obtención de cada tipo de nanopartícula liposomal. En el caso de liposomas tipo I (Figura 1A), el solvente de la mezcla de lípidos y JQ1 (1) se evapora a presión reducida para formar la película delgada (2), después se hidrata con agua destilada (3) y, posteriormente, la disolución se sonica durante 1 hora a 60°C. Para los liposomas tipo II (Figura 1B), el disolvente de la mezcla de lípidos (1) se evapora a presión reducida para formar la película delgada (3); después se hidrata con el agua destilada que contiene el complejo CD-JQ1 (3) y, posteriormente, se somete a ultrasonidos durante 1 hora a 60°C. En el caso de los liposomas tipo III (Figura 1C), el disolvente de la mezcla de lípidos y JQ1 (1) se evapora a presión reducida para formar la película delgada (2), después se hidrata con el agua destilada que contiene el complejo CD-JQ1 (3) y se sonica durante 1 h a 60°C. Finalmente, todas las muestras se centrifugan en concentradores *Amicon* de 100 kDa de corte de peso molecular (MWCO) a 2900 g durante 10 min y se lavan tres veces con agua destilada para eliminar los lípidos no complejados y el fármaco no encapsulado.

Cuando se necesita una sonda fluorescente, se prepara y añade Liss Rhod PE o Cy 5.5 (a 1 mg/ml den cloroformo) a la mezcla de lípidos, en una proporción del 0,2 % de la cantidad total de lípidos en moles.

20

Ejemplo 2. Influencia de la longitud de cadena de los lípidos mezclados.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de JQ1 se realiza encapsulación de JQ1 en membrana (a) de liposomas (liposomas tipo I) comparando el efecto de utilizar una mezcla de lípidos de cadena de 18 carbonos (DSP:PC:Gd-DTPA-BSA) con una mezcla de lípidos de cadena de 14 carbonos (DMPC:MHPC:Gd-DTPA-BSA), siendo en ambos casos la relación JQ1:lípidos en peso de 1:50. Como se muestra en la Tabla 1, la encapsulación con lípidos de cadena más corta (A) da lugar a mejores rendimientos que la encapsulación lípidos de cadena más larga (B). Para ambos tipos de lípidos se compara el rendimiento de encapsulación realizada añadiendo otros adyuvantes como el colesterol pero, como también se observa en la Tabla 1, no se consigue mejorar de forma significativa dicho rendimiento.

35

Tabla 1. Diferentes combinaciones de lípidos en diferentes relaciones molares con una relación en peso JQ1:lípidos de 1:50.

Rendimiento de encapsulación de Liposomas tipo I				
	Ratio molar			
Lípidos	A	B	C	D
DMPC	7.6			7.6
MHPC	1.1			1.1
Gd-DTPA-BSA	1.0	1.0	1.0	1.0
DSPC		7.6	7.6	
PC		1.1	1.1	
Colesterol (%)			17	17
Encapsulación (%)	50	36	4	52

5

Ejemplo 3. Influencia de la relación JQ1:lípidos

Para determinar la influencia de la relación JQ1:lípidos, en el caso de la mezcla de lípidos de cadena corta sin colesterol (A), se prueban relaciones JQ1:lípidos de 1:100 (E) y 1:30 (F). En la Tabla 2 se observa que no hay cambios significativos en términos de eficiencia de encapsulación. Por eso, se decide que la relación final JQ1:lípidos es 1:30 para utilizar una cantidad menor de lípidos por unidad de fármaco.

15

Tabla 2. Diferentes proporciones en peso de JQ1:lípidos para la combinación de lípidos de cadena corta

JQ1:Lípidos	A	E	F
1:100		x	
1:50	x		
1:30			x
Encapsulación (%)	50	55	48

20

Ejemplo 4. Eficacia de la encapsulación.

La eficiencia de encapsulación de JQ1 dentro de los liposomas se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para cada preparación se evaporó un volumen de muestra de 50 µL a 50 °C y luego se rehidrató en el mismo volumen con la fase móvil (80% acetonitrilo y 20% H₂O *milliQ*). La muestra se analizó utilizando una columna RP C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Gemini) con un flujo de 1 ml/min y una temperatura de columna de 25 °C. La fase móvil contenía 80 % de acetonitrilo y 20 %

25

de H₂O *milliQ*, la longitud de onda se fijó en 254 nm y el tiempo de elución de JQ1 fue de aproximadamente 5,4 min. El pico del compuesto se identificó utilizando una referencia estándar comercial.

- 5 Para los lípidos de cadena larga mostrados en la Tabla 1, se consiguió encapsular 7,2 µg de JQ1 por mg de lípidos; y para los de lípidos de cadena corta se encapsularon 10 µg de JQ1 por mg de lípidos.

- 10 Para el caso de la encapsulación de JQ1 en el núcleo de liposomas (liposomas tipo II) con una relación JQ1:lípidos de 1:30 utilizando lípidos de cadena corta y añadiendo ciclodextrina al 1% para formar un complejo con JQ1, el rendimiento de encapsulación resulta ser del 17,8 µg de JQ1 encapsulado por mg de lípidos.

- 15 Finalmente, para los liposomas tipo III, se consigue una encapsulación total de 36 µg de JQ1 por mg de lípidos.

Ejemplo 5. Caracterización fisicoquímica.

- 20 La formulación de liposomas de tipo III del ejemplo 4 se caracterizó por dispersión de luz dinámica (DLS), midiendo su radio hidrodinámico y su punto isoeléctrico (Figura 2).

- En cuanto al tamaño, se obtuvieron liposomas con un radio hidrodinámico medio de 66 nm y un índice de polidispersidad de 0,225 (Figura 2a). El tamaño y la morfología de los liposomas duales sintetizados también se estudiaron en TEM (Figura 2b), mostrando una morfología esférica sin agregados, y con un tamaño promedio de aproximadamente 60 nm. Estos datos están de acuerdo con los resultados obtenidos con DLS. Se estudió el punto isoeléctrico (pH en el que la carga neta de las nanopartículas es 0) obteniendo un valor de pH 6 (Figura 2C). Además, se encontró que la carga superficial era negativa, -5,53 mV a un pH fisiológico de 7.

- 30 Estos resultados son óptimos para obtener una formulación lipídica estable, de pequeño tamaño y carga superficial negativa a pH fisiológico. De hecho, en estas condiciones, no se espera que las nanopartículas se agreguen, manteniendo así sus propiedades coloidales óptimas.

35

Ejemplo 6. Caracterización de la capacidad de la NPs de actuar como agente de contraste dual en promover imagen molecular por Resonancia Magnética y Flruorescencia.

- 5 Dado que se ha diseñado un modelo de liposomas con diferentes componentes en su estructura, independientemente del fármaco que contengan, se han evaluado las diferentes posibilidades de obtención de imagen molecular que pueden proporcionar. El potencial global de los liposomas JQ1 como agentes de contraste para su uso en imagen molecular multimodal, se evaluó *in vitro* usando muestras modelos a diferentes
- 10 concentraciones de los mismos o “phantoms”. Por un lado, debido a la posible presencia de un fluoróforo en su estructura, mediante imagen óptica. Por otro lado, dada la incorporación de un agente de contraste como el gadolinio, mediante resonancia magnética (Figura 3).
- 15 Para ello, en primer lugar, se evaluaron las propiedades de los liposomas para la obtención de imágenes fluorescentes. Se midió la fluorescencia de diferentes concentraciones de liposomas y resultó que a mayor concentración de nanopartículas mayor era la intensidad de fluorescencia. Así, la fluorescencia dependiente de la concentración hace de estos liposomas buenos candidatos para su utilización en imagen
- 20 óptica tanto *in vitro* como *in vivo* (Figura 3a).

La caracterización también se llevó a cabo para evaluar el uso de estos liposomas como agentes de contraste en resonancia magnética, utilizando diferentes concentraciones de muestra (Figura 3b). Para ello, se miden tiempos de relajación (T_1 y T_2) para

25 diferentes diluciones de la concentración inicial de lípidos a base de gadolinio y, posteriormente, se calculan y representan las tasas de relajación correspondientes $R_1 = 1/T_1$ y $R_2 = 1/T_2$ frente a la concentración total de lípidos en cada muestra. Estas gráficas se ajustan a regresiones lineales para obtener las pendientes r_1 y r_2 que corresponden a la relaxividad iónica de la muestra en estudio. Así, se obtuvieron valores

30 de $13,96 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $19,43 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para r_1 y r_2 , respectivamente, obteniendo así un valor de r_2/r_1 de 1,39 (Figura 3c). Esta relación indica la tendencia del agente de contraste a promover una perturbación de la relajatividad longitudinal o transversal del agua durante la generación de la imagen por resonancia magnética. Cuanto más se acerque al valor de 1 esta relación, tanto más su tendencia será la generación de una perturbación de la

35 relajatividad longitudinal. En este caso, se dice que el contraste es de tipo positivo (T_1),

generando una imagen más blanca y brillante donde el agente molecular se encuentra más concentrado. Como era de esperar, en “phantoms” de resonancia magnética de una serie de diluciones en una secuencia ponderada en T1, se generó un contraste blanco positivo de manera dependiente de la concentración (Figura 3b).

5

En consecuencia, gracias a la presencia de lípidos basados en Gd y basados en fluorescencia en su membrana, se espera que estos liposomas actúen eficientemente como agentes de contraste moleculares duales en resonancia magnética ponderada en T1 e imágenes de fluorescencia in vivo (IVIS), respectivamente.

10

Ejemplo 7. Viabilidad celular.

Para evaluar la viabilidad celular de los tres tipos de liposomas obtenidos, se evalúa su efecto sobre la línea celular epitelial tubular renal HK-2 mediante ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) después del tratamiento con JQ1 nanoencapsulado (NPs-JQ1) durante 24 horas.

15

Las células se tratan con JQ1 (+) sin encapsular o su enantiómero inactivo JQ1 (-), o con JQ1 (+) encapsulado en NP liposomales de tipos I, II y III. Se utilizan NP vacías (nanopartículas sin JQ1) para evaluar las toxicidades independientes de NP y JQ1. Los resultados (Figura 4) se expresan como porcentaje respecto a las células control (células sin tratar, barras negras).

20

Se observa que los tres tipos de liposomas se comportan igual en términos de citotoxicidad, provocando que todos ellos solamente reduzcan alrededor del 20% la viabilidad celular a la dosis más alta de JQ1 (500 nM). Además, esta reducción fue la misma que la detectada tras el tratamiento de las células con JQ1 sin encapsular para el mismo tiempo y dosis.

25

Dado que el ensayo de MTT solamente mide la actividad metabólica de las células, se realiza también el ensayo de anexina V/7AAD para evaluar la muerte celular y la apoptosis después del tratamiento de las células únicamente con NPs-JQ1 tipo III, y comparándolo con JQ1 (+) sin encapsular o su enantiómero inactivo JQ1(-), obteniéndose resultados similares (Figura 5). Los datos muestran que, en todos los casos, el porcentaje de células apoptóticas y necróticas fue inferior al 12%.

30

35

Ejemplo 8. Eficacia *in vitro* de nanopartículas cargadas con JQ1

Se evalúa la captación celular de las nanopartículas diseñadas (NPs-JQ1 tipo III) por parte de la línea de células epiteliales tubulares renales HK-2 (tipo de células diana) ya que la internalización en la célula diana es un requisito previo para la actividad adecuada del fármaco encapsulado. Las células se cultivan en medio RPMI 1640 Gibco™ suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, 1% de insulina-transferrina-selenio Gibco™ (ITS-G) y 5 ng/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich®).

Se añaden nanopartículas marcadas el fluoróforo Rojo de Rodamina (RdR) a cultivos de células HK-2 durante 1, 3, 6, 18 y 24 h a una concentración fija de 500 nM de JQ1 (equivalente a una dosis de lípidos de 25 µM) y se analizan por citometría de flujo. En la Figura 6A se muestra la intensidad fluorescente de la captación por nanopartículas de RdR en células HK-2 en comparación con las células de control no tratadas en 1, 3, 6, 18 y 24 h, apreciándose que las células incorporaron eficientemente las nanopartículas JQ1 y detectándose un índice de máxima intensidad de fluorescencia (MIF) a las 24 h, donde casi el 100% de las células son positivas para el Rojo de Rodamina (Figura 6B).

Se procede, entonces, a realizar experimentos funcionales a las 24 h analizándose la expresión génica de *IL6* y *CCL2* (dianas conocidas del inhibidor BET JQ1) por qPCR en células HK-2, tras estimulación con TNF- α . El efecto de JQ1 encapsulado (NPs-JQ1 tipo III) se compara con su homólogo no encapsulado a las mismas dosis y a las 24 h. Las nanopartículas vacías y el enantiómero negativo inactivo JQ1(-) se usaron como sus respectivos controles negativos. En las Figuras 6C y D se muestran los resultados y se deduce que las NP-JQ1 ejercen el mismo efecto en la disminución de la expresión de *IL6* y *CCL2* en comparación con el JQ1 libre y de manera dependiente de la dosis (10 - 250 nM), lo que significa que todo el JQ1 encapsulado en la nanopartícula es funcional y se libera de manera eficiente en la célula objetivo; mientras que las nanopartículas vacías y el JQ1(-) no afectaron a la expresión génica, como era de esperar.

Ejemplo 9. Distribución *in vivo* de nanopartículas sobre modelo animal de lesión por isquemia – reperfusión bilateral (bIRI)

Para llevar a cabo el estudio de la eficacia *in vivo* de las NPs-JQ1 tipo III se utilizan ratones de tipo salvaje C57BL/6N (Janvier Labs.) que es una cepa congénica (homogénea genéticamente). De forma más concreta, se utilizan animales de 8 a 10 semanas de edad y se aclimatan durante 1 semana antes del estudio. Este estudio fue previamente aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (España) y se realiza de acuerdo con las directrices legislativas y reglamentarias europeas y españolas (convenio europeo ETS 123, sobre uso de y protección de mamíferos vertebrados para experimentación y otros fines científicos; Ley 6/2013 y Real Decreto RD 53/2013, sobre protección y uso de animales en investigación científica), haciendo todo lo posible para minimizar las molestias causadas a los ratones.

En primer lugar, se analiza la distribución *in vivo* de las NPs-JQ1 tipo III conjugadas con el fluoróforo Cy5.5 y administradas a ratones por vía intraperitoneal después de 45 minutos de isquemia o en ratones operados de forma simulada. Para ello, se toman imágenes utilizando el sistema de imágenes *in vivo* IVIS a las 1, 3, 6 y 24 h después de la inyección de nanopartículas. La epifluorescencia detectada (Figura 7a) desde la posición dorsal de los ratones indica que las nanopartículas llegan a los riñones tan pronto como 1 h después de la inyección y se mantienen en el órgano después de 24 horas. Por otra parte, las imágenes ventrales muestran que las nanopartículas se diseminan por todo el peritoneo en tiempos cortos (1-3 horas) pero, finalmente, se reubican en la zona superior-media, correspondiente al hígado, a tiempos más largos (Figura 7b).

Estos resultados se corroboran cuantitativamente a las 24 horas por detección de epifluorescencia *ex vivo* de órganos donde la máxima acumulación de nanopartículas se detecta en el hígado, seguido del páncreas y los riñones (Figuras 7b y 7c). En tiempos cortos desde la administración, se detecta una gran captación por parte de los riñones. Estos resultados se han confirmado por medio de análisis *ex vivo*, determinando que las nanopartículas llegan a los riñones.

Ejemplo 10. Eficacia *in vivo* de nanopartículas cargadas con JQ1 sobre modelo animal de lesión por isquemia – reperfusión bilateral (bIRI)

Una vez comprobada la distribución de las nanopartículas en los órganos de los ratones (ejemplo 9), se evalúan diferentes dosis (10, 20, 30 y 40 mg/kg) de NPs-JQ1 tipo III *in*

vivo para el modelo de daño renal inducido por reperfusión isquémica bilateral (bIRI). Las NPs-JQ1 se administran por vía intraperitoneal 1 hora después de la isquemia y sus efectos se analizan después de 24 horas de reperfusión.

5 Se analiza el marcador de daño renal NGAL por la técnica *Western Blot* (WB) (Figura 8a) y qPCR y (Figura 8b), y comparándolo con los niveles de ratones simulados e isquémicos tratados con NPs vacías (nanopartículas sin JQ1). Los resultados muestran una reducción significativa de NGAL y dependiente de la dosis en ratones tratados con 30 y 40 mg/kg de NPs-JQ1.

10

A continuación, se miden los parámetros de la función renal, los niveles de nitrógeno ureico en sangre (Figura 8c) y creatinina (Figura 8d), en muestras de sangre recogidas mediante punción cardiaca. La creatinina sérica y la urea se determinan utilizando un kit de ensayo de creatinina (ab204537, *Abcam*) y un kit de detección calorimétrica de nitrógeno ureico en sangre K024-H5, *Arbor Assays*), respectivamente. Solamente se detecta una reducción significativa de ambos parámetros a la dosis más alta de 40 mg/kg.

15

Ejemplo 11. Eficacia y toxicidad de la entrega de JQ1 mediada por liposomas.

20

Con el fin de comprobar que las nanopartículas NPs-JQ1 tipo III contribuyen a reducir la dosis efectiva de JQ1 a través de su formulación en NPs basadas en liposomas en el modelo bIRI de riñón, se analizan marcadores de daño renal y parámetros funcionales en ratones tratados con la dosis de JQ1 de 40 mg/kg y se comparan los resultados entre su formulación encapsulada y no encapsulada (JQ1 libre). Para ello, se realiza el mismo diseño experimental (ejemplo 10) y se administra JQ1 libre a 40 mg/kg 1 hora después de la reperfusión y se analizan marcadores de daño y función renal a las 24 horas (Figura 9).

25

30 Los resultados muestran que JQ1 no encapsulado no tiene efecto en disminuir el marcador de lesión tisular NGAL, evaluado por WB y qPCR (Figura 9a) y (Figura 9b). Además, la tinción de PAS (*Periodic Acid-Schiff*) utilizada para evaluar el daño patológico (Figura 9c), mostró que, en la zona cortico-medular, la cual es el área más afectada en el riñón después de un daño renal isquémico, mostró una reducción en la necrosis tubular tras la administración de NPs-JQ1 tipo III, detectada por la presencia de células

35

tubulares desprendidas o mudadas y la pérdida de borde en cepillo. Adicionalmente, hay una reducción en el número de depósitos intratubulares, o “casts”, compuestos por células liberadas, proteínas u otros materiales que obstruyen el túbulo e impiden la función normal del riñón. En conjunto, se detectó un menor daño renal en los ratones
5 tratados con las NPs-JQ1 que en estos tratados con el JQ1(+) sin encapsular.

En relación a los niveles de nitrógeno ureico en sangre (Figura 9d) y creatinina sérica (Figura 9e), los resultados muestran que la formulación de JQ1 libre no reduce significativamente ninguno de estos 2 parámetros, al contrario de la reducción
10 observada con el JQ1 encapsulado (Figura 8d y 8e).

Además, se determina la toxicidad *in vivo* mediante el análisis de marcadores séricos hepáticos (Figura 10A) y la evaluación histológica del hígado (Figura 10B), encontrándose que los ratones tratados con NPs-JQ1 presentan una mejor función
15 hepática en comparación con JQ1 libre. Los animales tratados con las NPs-JQ1 tienen reducidos niveles de los enzimas hepáticos ALT, AST y AKP y a nivel histológico, la degeneración hidrópica(hinchazón/dilatación) de los hepatocitos observada en los hígados de los ratones tratados con JQ1(+) sin encapsular es mucho mayor que en los que se les administró las NPs-JQ1.

20 Por otra parte, a los ratones no isquémicos (ratones control), se les administra una dosis de 40 mg/kg de JQ1 encapsulado (NPs-JQ1 tipo III) y se miden sus cambios en el peso corporal, no encontrándose diferencias desde el día 1 al día 14 (Figura 11). Finalmente, los datos del hemograma y recuento de células sanguíneas (Tabla 3) confirman que las
25 NPs-JQ1 no son tóxicas, ya que no se detectan diferencias significativas respecto a las NPs vacías, a los diferentes tiempos evaluados.

Estos resultados demuestran que la encapsulación de JQ1 en NPs de liposomas ofrece una mejora importante al aumentar la eficacia del fármaco y reducir su toxicidad en el
30 modelo de la bIRI renal.

Tabla 3. Hemograma y recuento de células sanguíneas de ratones tratados con NPs-JQ1. A los ratones se les administró IP NPs-JQ1 a una dosis de 40 mg/kg y muestras de sangre analizadas los días 1, 7 y 14 después. Los resultados son medias y $\pm$ SD se indica de 5 animales por grupo.

	Neu (%)	Lym (%)	Mo (%)	Eos(%)	Bas(%)	RBC (10 ¹² /L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW-CV (%)	PLT (10 ⁹ /L)	MPV (fL)	
Control	18.95 ± 3.74	75.5 ± 4.03	1.6 ± 0.56	3 ± 1.83	0.9 ± 0.98	7.52 ± 0.09	11.55 ± 0.92	32.85 ± 1.76	43.7 ± 1.83	15.35 ± 1.06	35.1 ± 0.84	12.75 ± 1.06	708 ± 22.62	4.9 ± 0.14	
Day 1	NPs w/o JQ1	15.57 ± 3.88	80.77 ± 3.97	0.93 ± 0.06	1.73 ± 0.40	1 ± 0.36	7.56 ± 0.31	12.07 ± 0.60	34.57 ± 1.03	45.7 ± 0.74	15.97 ± 0.21	34.97 ± 0.81	12.27 ± 0.64	415.33 ± 187.87	5.5 ± 0.46
	NPs JQ1	11.53 ± 2.29	84.53 ± 5.55	0.70 ± 0.35	3 ± 3.27	0.23 ± 0.12	7.87 ± 0.65	12.53 ± 0.99	35.70 ± 3.03	45.33 ± 0.15	15.90 ± 0.10	35.13 ± 0.32	12.33 ± 0.47	572.67 ± 106.80	5.30 ± 0.10
	NPs w/o JQ1	20.84 ± 4.25	91.27 ± 18.62	3.29 ± 0.67	2.40 ± 0.49	1.10 ± 0.22	7.87 ± 1.17	13.17 ± 1.91	36.43 ± 4.45	41.53 ± 5.14	14.75 ± 1.82	33.42 ± 3.19	11.39 ± 1.41	620.17 ± 191.72	6.27 ± 1.59
Day 7	NPs JQ1	15.55 ± 2.90	73.15 ± 10.38	2.68 ± 0.75	1.63 ± 0.57	0.66 ± 0.31	7.91 ± 0.66	12.71 ± 1.08	36.02 ± 3.15	43.31 ± 3.74	15.26 ± 1.37	35.23 ± 0.38	11.40 ± 1.04	482.75 ± 158.47	5.15 ± 0.42
	NPs w/o JQ1	15.80 ± 1.86	85.57 ± 3.01	1.70 ± 0.36	1.80 ± 1.25	0.40 ± 0.26	7.37 ± 0.16	11.77 ± 0.15	33.50 ± ±0.17	45.50 ± 0.78	16.03 ± 0.15	35.23 ± 0.38	11.70 ± 0.20	662 ± 88.39	5.13 ± 0.06
Day 14	NPs JQ1	18.25 ± 3.65	82.30 ± 4.28	2.6 ± 0.20	2.27 ± 1.51	0.67 ± 0.21	7.75 ± 0.29	12.50 ± 0.44	35.37 ± 1.40	45.63 ± 0.23	16.17 ± 0.06	35.43 ± 0.29	11.53 ± 0.25	538 ± 114.84	4.97 ± 0.25

Neu: neutrófilos; Lym: linfocitos; Mo: monocitos; Eos: Eosinófilos; Bas: basófilos; RBC: glóbulos rojos; HGB: Hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: Volumen corpuscular medio (tamaño medio de glóbulos rojos); MCH: Hemoglobina corpuscular media (cantidad media de hemoglobina en glóbulos rojos); MCHC: Concentración media de hemoglobina corpuscular (cantidad media de hemoglobina por unidad de volumen en un solo RBC); RDW CV: RBC Distribution Width (rango de variación del volumen de RBC); PLT: plaquetas; VPM: Volumen Plaquetario Medio.

Ejemplo 12. Disminución de la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y de la infiltración de células mieloides en el riñón por administración de NPs-JQ1.

5

En la IRI la inflamación se vuelve excesiva; donde las células inmunitarias innatas desempeñan un papel fundamental en la mediación de la respuesta a la lesión. Después de un episodio isquémico se produce un gran aumento de citocinas y quimiocinas proinflamatorias dentro del tejido y las células inmunitarias innatas, neutrófilos y monocitos, se reclutan masivamente tras la reperusión, lo cual agrava aún más el daño tisular. Por lo tanto, frenar de forma temprana la respuesta inflamatoria es clave para mejorar el daño renal tras la isquemia. Por este motivo, se considera adecuado este modelo para analizar la mejora de la eficacia de JQ1 causada por su encapsulación en NPs liposomales.

15

Se comparan los efectos antiinflamatorios de JQ1 encapsulado frente al no encapsulado a las 24 horas después de la bIRI usando la dosis de 40 mg/kg y el tiempo de administración de 1 hora después de la isquemia. La Figura 12a muestra que solamente el JQ1 contenido dentro de las NPs podría disminuir el nivel de expresión de citocinas como *Il6* y quimiocinas como *Csf2*, *Ccl2*, *Ccl5*, en contraste con JQ1 libre que no muestra ningún efecto. Se detecta, en consecuencia, una disminución de la infiltración de neutrófilos (CD45⁺ CD11⁺ Ly6G^{hi} Ly6C^{low}) y de monocitos (CD45⁺ CD11⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{hi} F4/80^{low}) dentro del riñón, mediante citometría de flujo, en el grupo de ratones a los que se administra NPs-JQ1. Por el contrario, no se detectan diferencias significativas cuando se administra JQ1 libre a los ratones (Figura 12b-d).

25

Ejemplo 13. Efecto de NPs-JQ1 en la progresión de la fibrosis renal postisquémica.

30 Se examina si la inhibición de la carga inflamatoria en la fase aguda de la bIRI renal puede ser suficiente para preservar la función del órgano a largo plazo, ya que la infiltración de células inflamatorias es un factor clave en el desarrollo de la posterior fibrosis.

35 Para ello, se realiza un modelo de bIRI de 30 minutos, ya que el modelo de isquemia de

45 minutos resulta letal a los 3 o 4 días y, por lo tanto, no se podría evaluar la progresión de los animales. Siguiendo el modelo experimental descrito en el ejemplo 10, 1 hora después de la isquemia se administra a los ratones una dosis de 40 mg/kg de NPs-JQ1 tipo III y se analiza el daño tras 21 días.

5

En la Figura 13a se observa una disminución notable de la expresión de genes profibróticos, como la Fibronectina 1 (*Fib-1*), proteína específica de fibroblastos (*Fsp-1*), actina de músculo liso α (α -*Sma*) y colágeno 1 α 1 (*Col1 α 1*), en el grupo de ratones inyectados con NPs-JQ1 en contraste con el grupo de ratones de control a los que se administraron NPs vacías. La disminución de algunas de estas moléculas pro-fibróticas también es validada por técnica *Western Blot* y se detecta una disminución notable en el grupo de ratones tratados con NPs-JQ1 (Figura 13b). Mediante tinción tricrómica de Masson, se determina que la administración de una sola dosis de 40 mg/kg de NPs-JQ1 es suficiente para mejorar la fibrosis intersticial en el día 21 (Figura 13c). Los niveles del marcador del daño renal NGAL, analizados por pPCR, no son tan altos como los observados en la fase aguda, pero se aprecia una disminución significativa en el grupo de ratones tratados con NPs-JQ1 (Figura 13d). Del mismo modo, la interrupción del mal funcionamiento renal en el grupo de ratones tratados con NPs-JQ1 se evidencia por la disminución de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en el suero de los ratones tratados comparados a los que se administra las NPs vacías (Figura 13e).

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanoformulaciones de inhibidores BET que comprenden nanopartículas de base lipídica que contienen el inhibidor JQ1 caracterizadas porque el inhibidor JQ1 se encuentra encapsulado en liposomas con una mezcla de lípidos de cadena C₁₄ a C₁₈, en una proporción JQ1:lípidos comprendida entre 1:30 y 1:100 (p/p).
- 10 2. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde la mezcla de lípidos es DSP:PC:Gd-DTPA-BSA.
3. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde la mezcla de lípidos es DMPC:MHPC:Gd-DTPA-BSA.
- 15 4. Nanoformulaciones, según reivindicaciones 2 y 3 donde la proporción de lípidos en la mezcla es 7,6:1,1:1,0.
5. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde se añade como aditivo colesterol.
- 20 6. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde la mezcla de lípidos contiene Liss Rhod PE.
7. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde la mezcla de lípidos contiene Cy 5.5.
- 25 8. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde el inhibidor JQ1 se encuentra encapsulado en la membrana de los liposomas.
- 30 9. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde el inhibidor JQ1 se encuentra encapsulado en el núcleo de los liposomas.
10. Nanoformulaciones, según reivindicación 1, donde el inhibidor JQ1 se encuentra encapsulado tanto en la membrana como en el núcleo de los liposomas.
- 35 11. Método de obtención de nanopartículas liposomales que contienen JQ1, según reivindicación 8, que comprende:

- Preparar una disolución conteniendo lípidos de cadena C_{14} a C_{18} (DMPC, MHPC, Gd-DTPA-BSA) disolviendo en cloroformo (para DMPC) o cloroformo-metanol 3:1 (v/v) (para MHPC y Gd-DTPA-BSA)
- Preparar una disolución de JQ1 en acetonitrilo.
- 5 - Mezclar las disoluciones anteriores
- Evaporar los disolventes para obtener una película delgada
- Hidratar la película delgada con agua destilada
- Promover el levantamiento de la película delgada con la solución de hidratación y fomentar la formación de las nanopartículas lipídicas.
- 10
- 12. Método de obtención de nanopartículas liposomales que contienen JQ1, según reivindicación 9, que comprende:
- Preparar una disolución conteniendo lípidos de cadena C_{14} a C_{18} (DMPC, MHPC, Gd-DTPA-BSA) disolviendo en cloroformo (para DMPC) o cloroformo-metanol 3:1 (v/v) (para MHPC y Gd-DTPA-BSA)
- 15 - Evaporar los disolventes de la mezcla de lípidos para obtener una película delgada
- Preparar una disolución de JQ1 en acetonitrilo
- 20 - Preparar un complejo de ciclodextrina y JQ1 (CD-JQ1) en agua destilada a partir de la disolución de JQ1 en acetonitrilo
- Hidratar la película delgada con el agua destilada que contiene el complejo de ciclodextrina y JQ1
- Crecer la película delgada
- 25
- 13. Método de obtención de nanopartículas liposomales que contienen JQ1, según reivindicación 10, que comprende:
- Preparar una disolución conteniendo lípidos de cadena C_{14} a C_{18} (DMPC, MHPC, Gd-DTPA-BSA) disolviendo en cloroformo (para DMPC) o cloroformo-metanol 3:1 (v/v) (para MHPC y Gd-DTPA-BSA)
- 30 - Preparar una disolución de JQ1 en acetonitrilo.
- Mezclar las disoluciones anteriores
- Evaporar los disolventes de la mezcla de lípidos y JQ1 para obtener una película delgada
- 35 - Preparar un complejo de ciclodextrina y JQ1 en agua destilada a partir de la

disolución de JQ1 en acetonitrilo.

- Hidratar la película delgada con el agua destilada que contiene el complejo de ciclodextrina y JQ1
- Crecer la película delgada

5

14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la mezcla de lípidos se obtiene disolviendo DMPC en cloroformo y MHPC y Gd-DTPA-BSA en una mezcla de cloroformo y metanol (proporción 3:1 (v/v)).

10

15. Método, según reivindicación 14, donde la disolución de JQ1 se prepara disolviendo JQ1 en acetonitrilo.

16. Método, según reivindicación 15, donde los disolventes se evaporan a presión reducida.

15

17. Método, según reivindicación 14, donde el crecimiento de la película delgada se realiza mediante ultrasonidos y con temperatura de 60°C.

20

18. Método, según reivindicaciones 12 y 13, donde la relación ciclodextrina y JQ1 en el complejo es 9:1 en volumen.

19. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde se añade Liss Rhod PE o Cy 5.5 a la mezcla de lípidos para obtener una sonda fluorescente.

25

20. Método, según reivindicación 18, donde Liss Rhod PE o Cy 5.5 se añaden en una proporción del 0,2 % de la cantidad total de lípidos en moles.

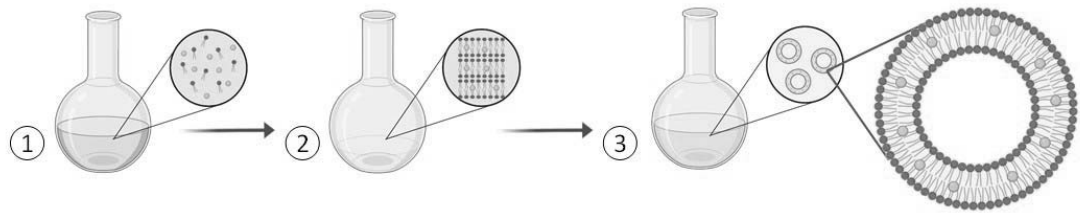
21. Uso de las nanoformulaciones reivindicadas en la diagnosis de patología renal aguda y crónica.

30

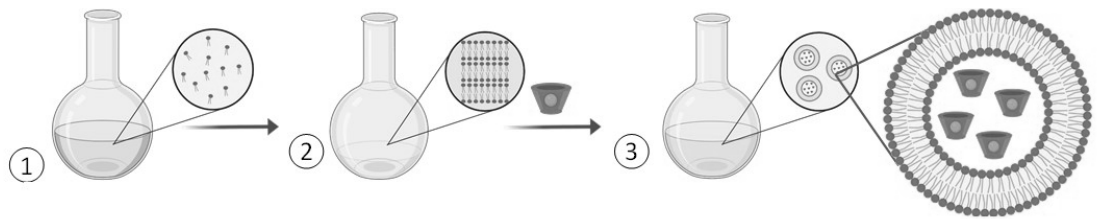
22. Uso de las nanoformulaciones reivindicadas en la terapia y seguimiento de patología renal aguda y crónica.

35

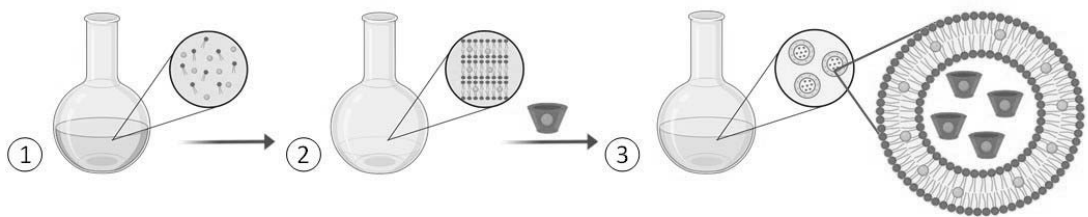
23. Uso de las nanoformulaciones reivindicadas en la teragnosis de patología renal aguda y crónica.



(A)



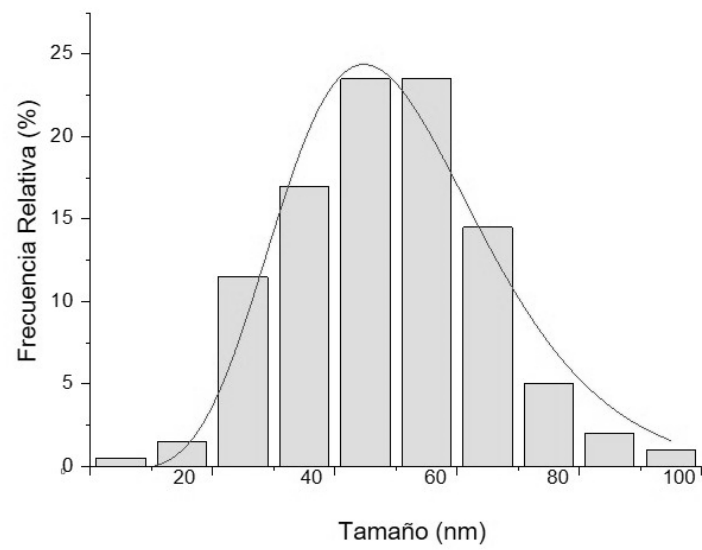
(B)



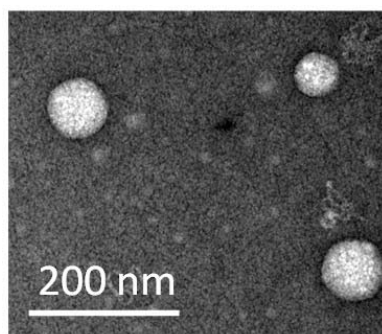
(C)

Figura 1

a)



b)



c)

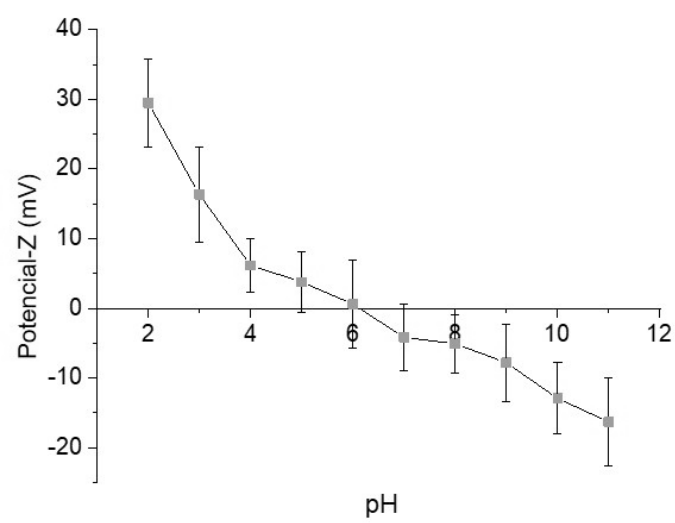


Figura 2

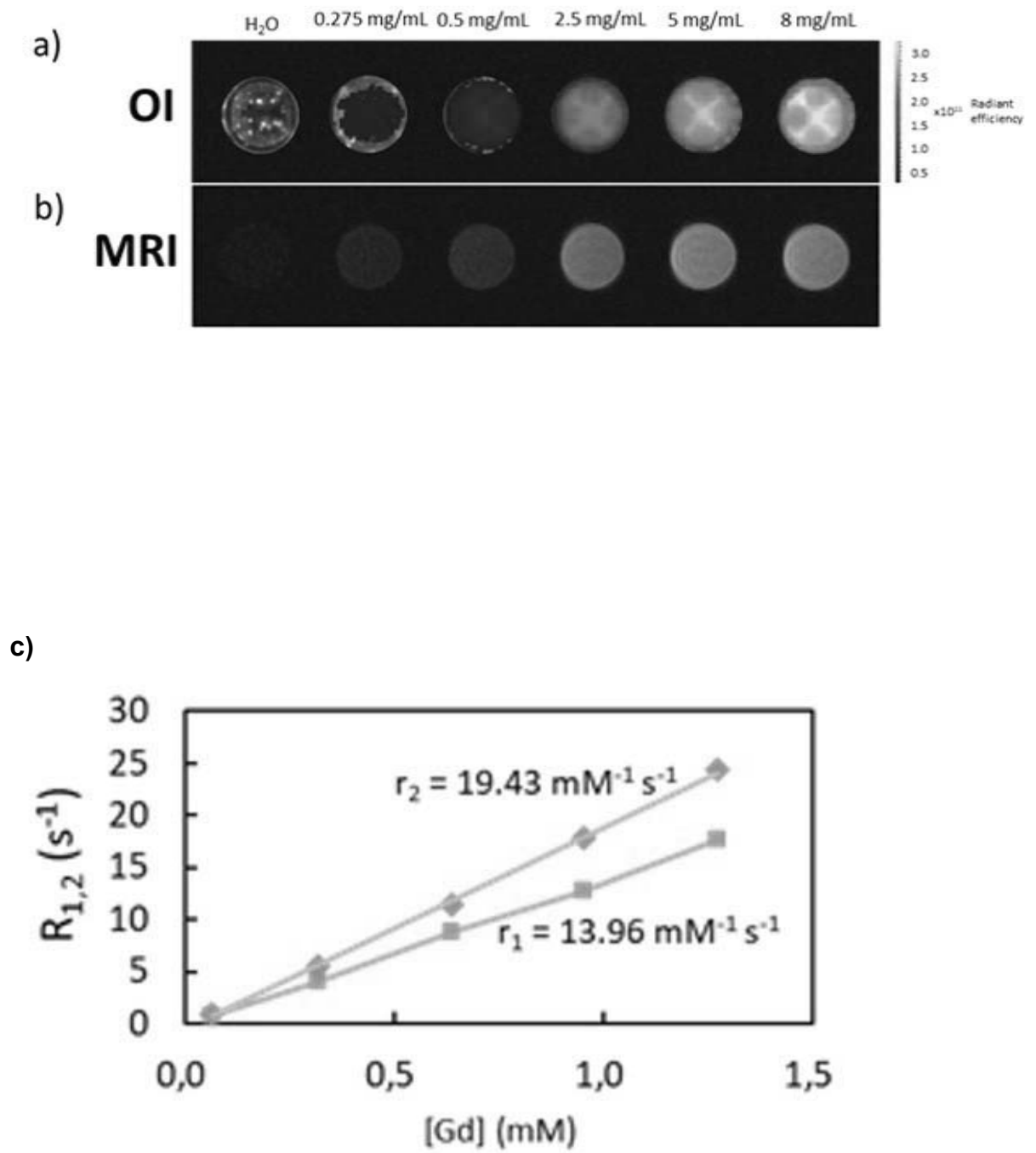


Figura 3

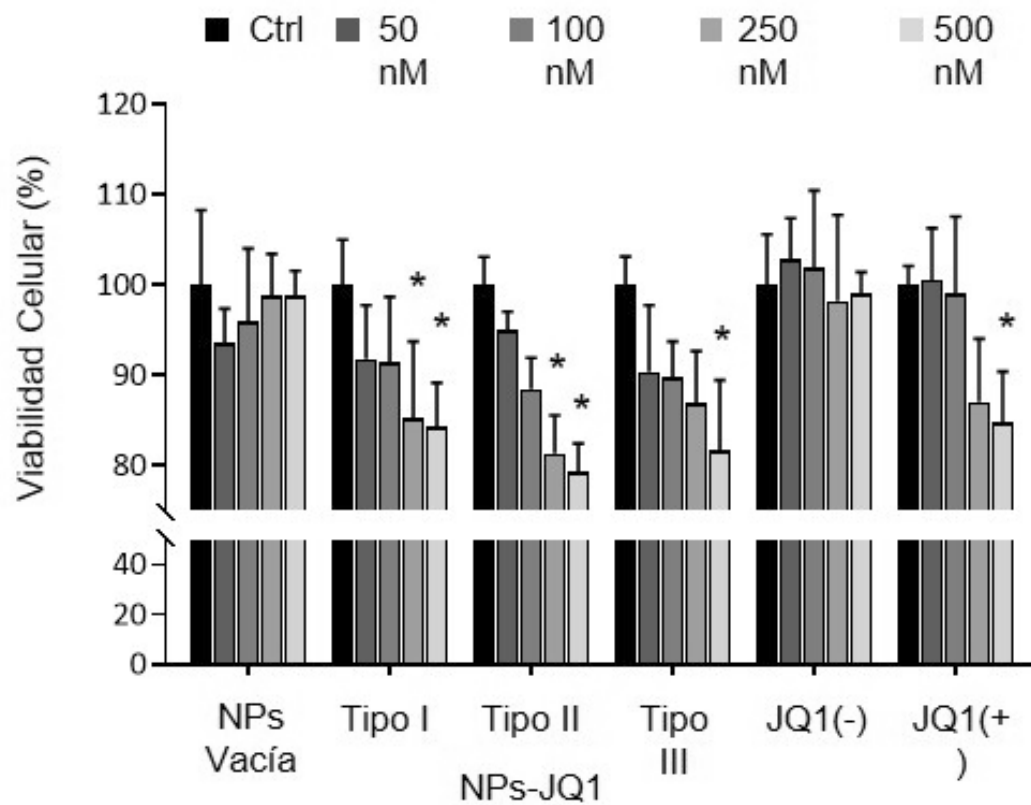


Figura 4

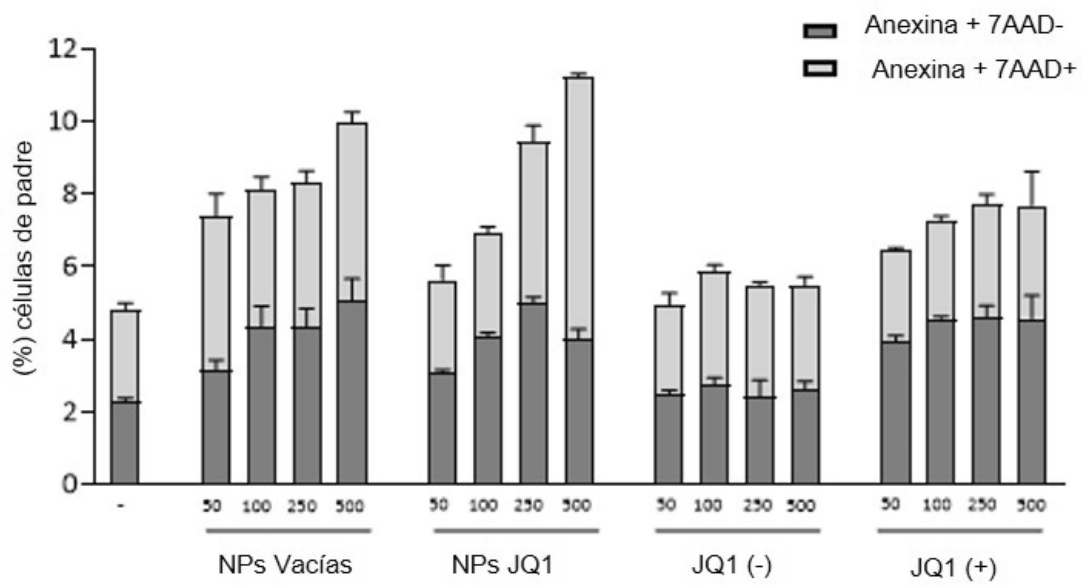


Figura 5

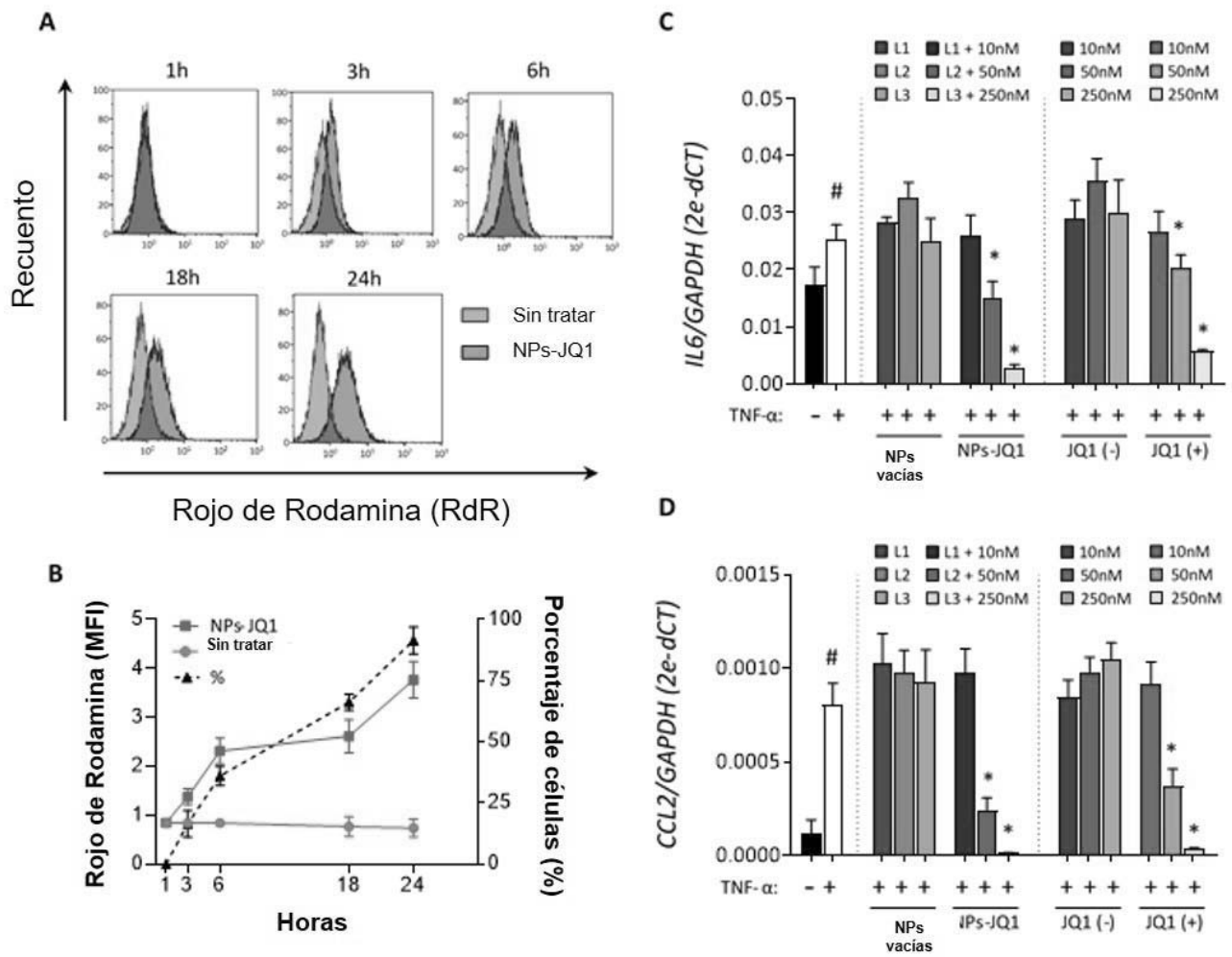


Figura 6

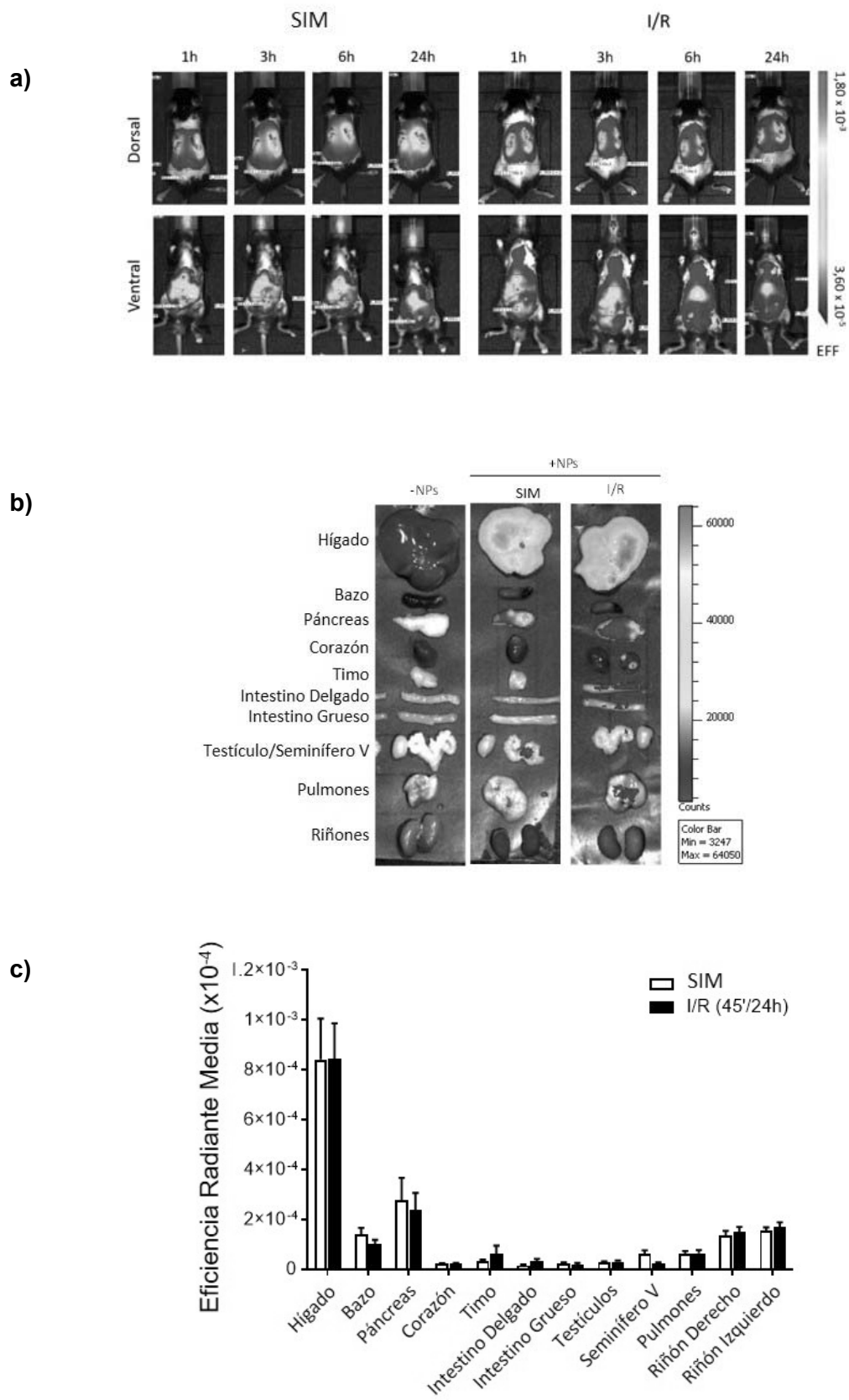
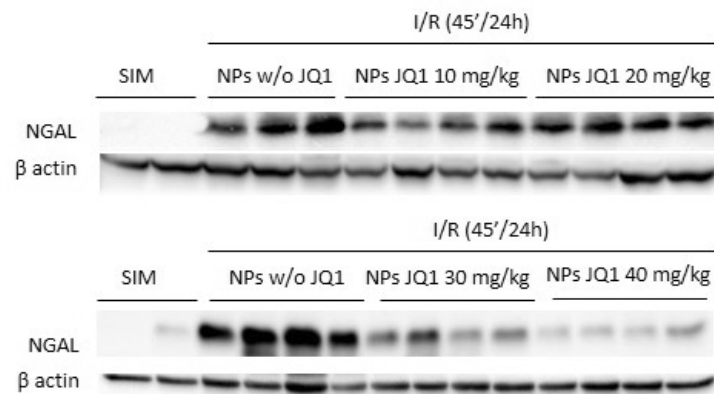
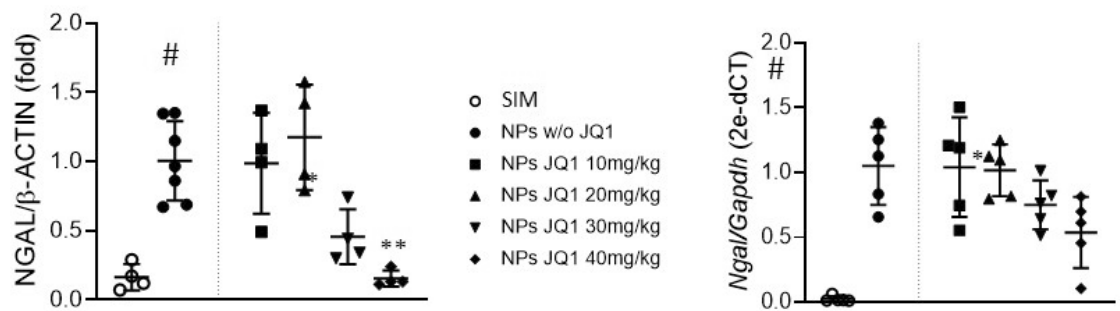


Figura 7

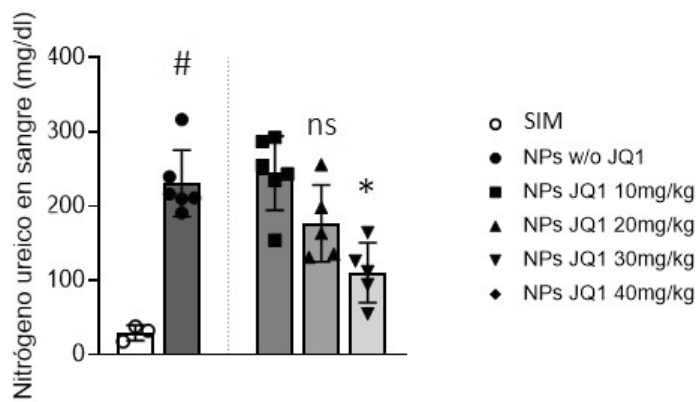
a)



b)



c)



d)

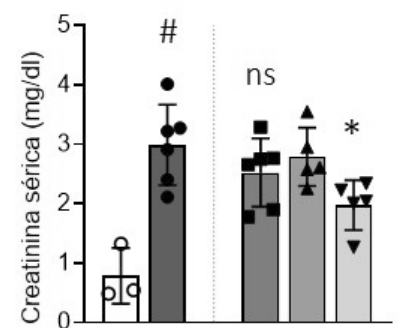


Figura 8

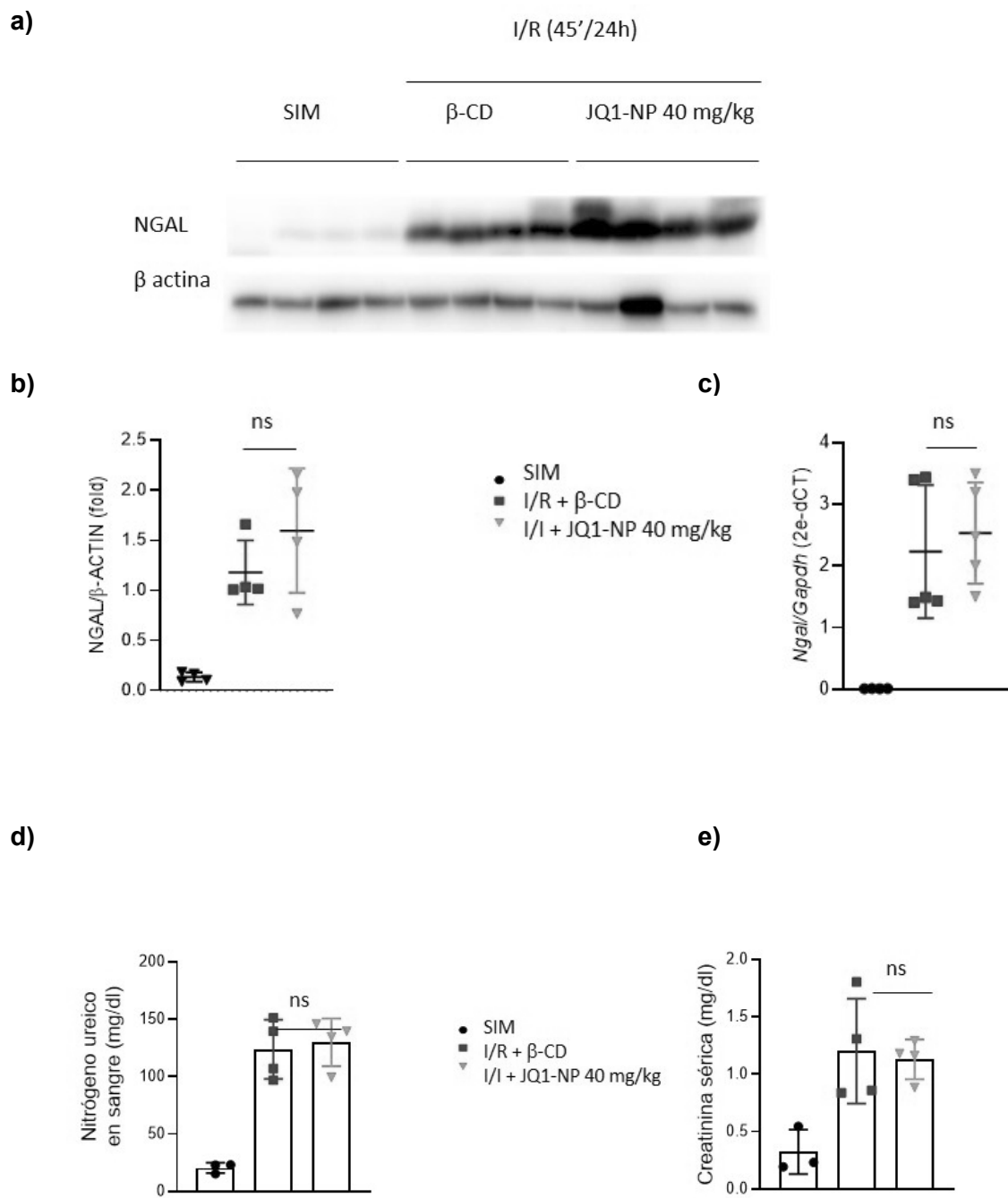


Figura 9

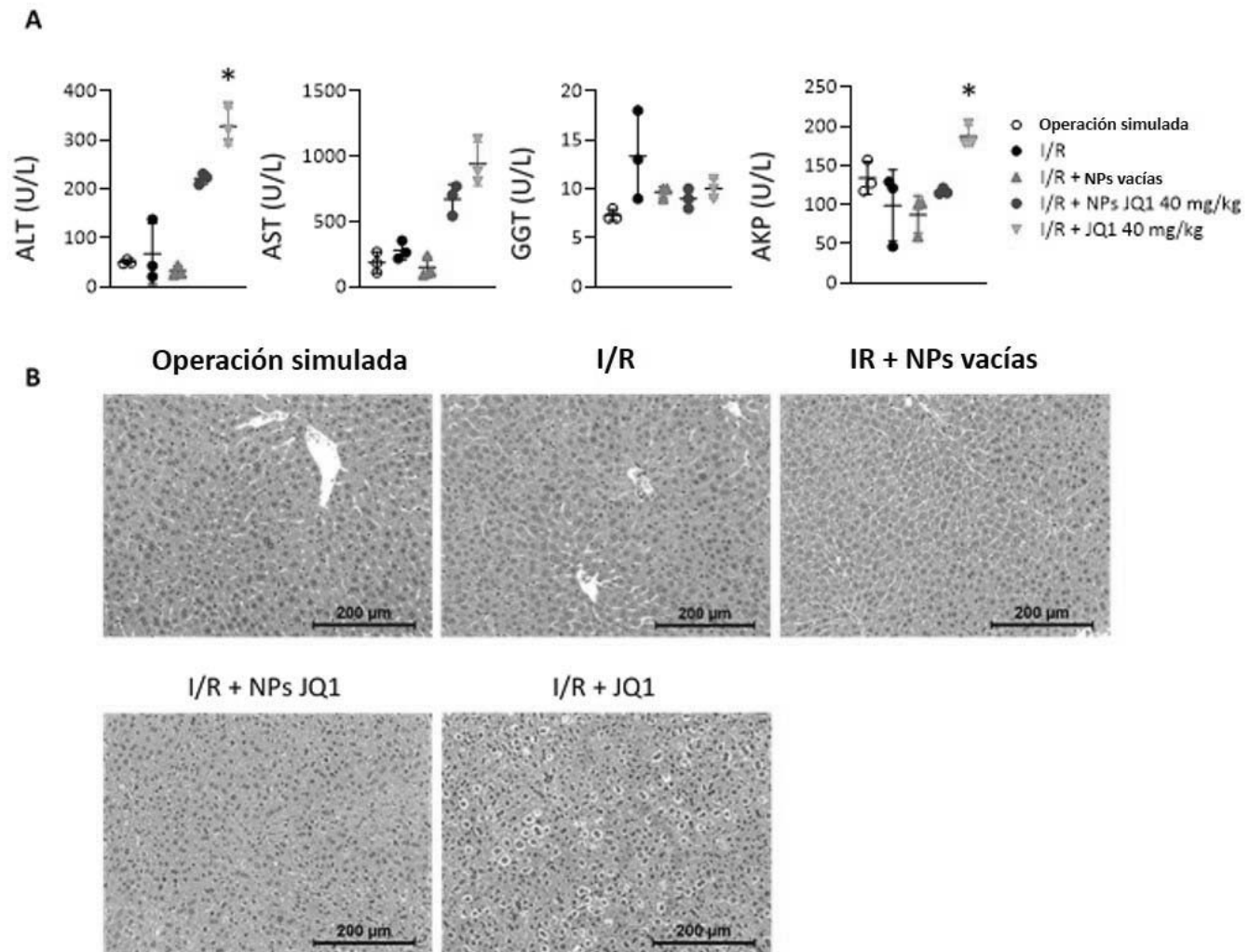
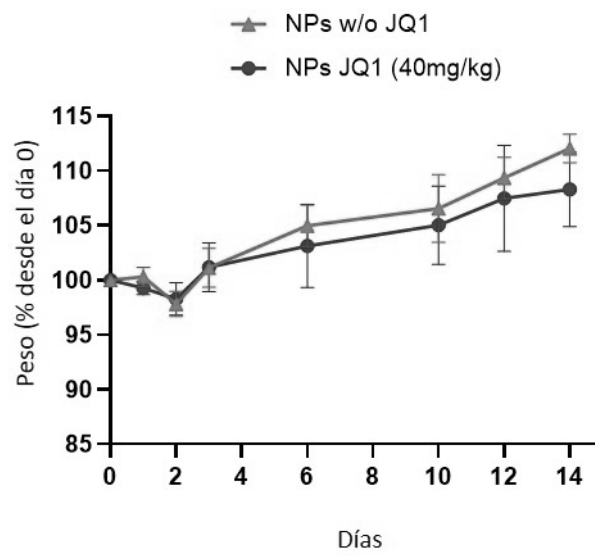


Figura 10

**Figura 11**

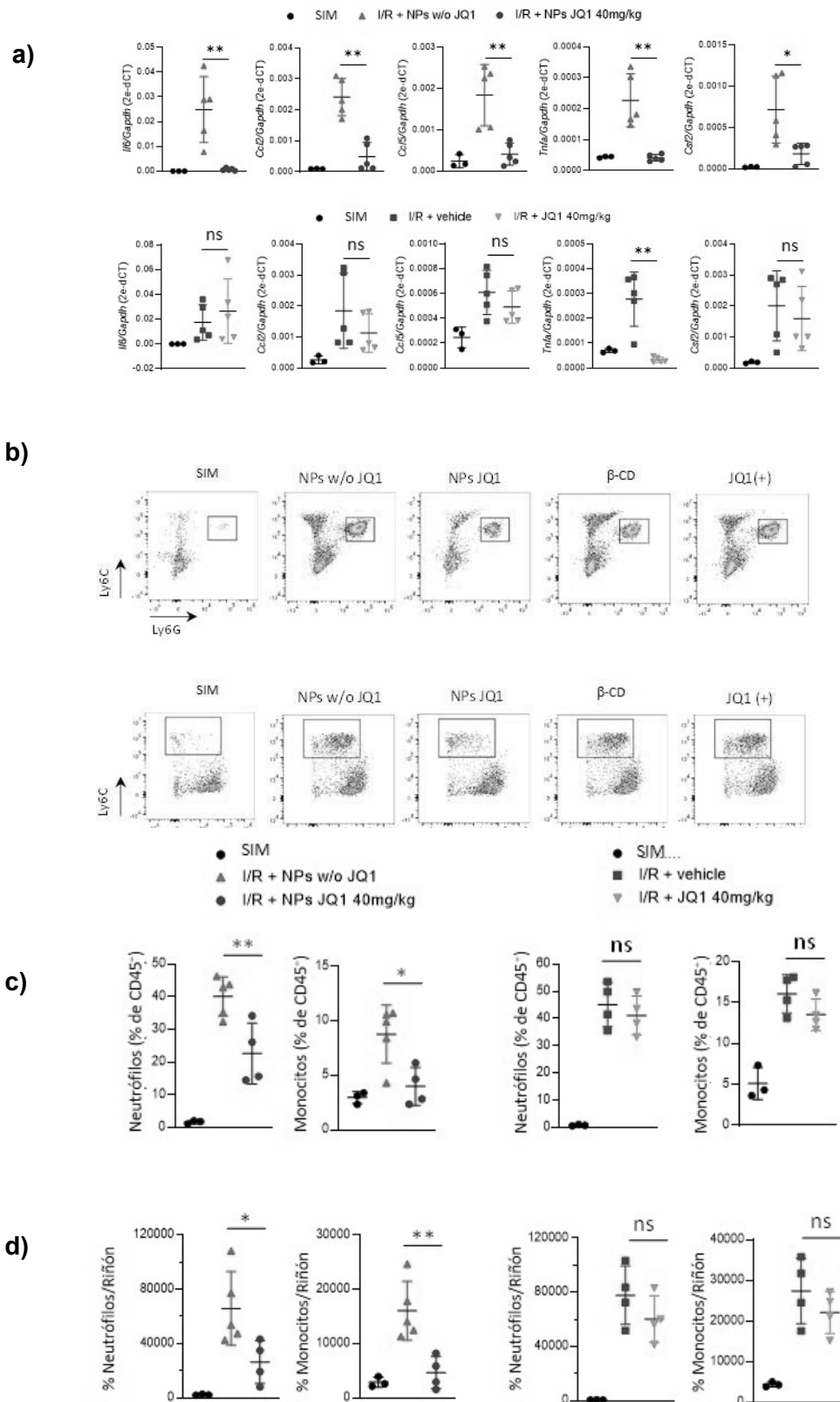
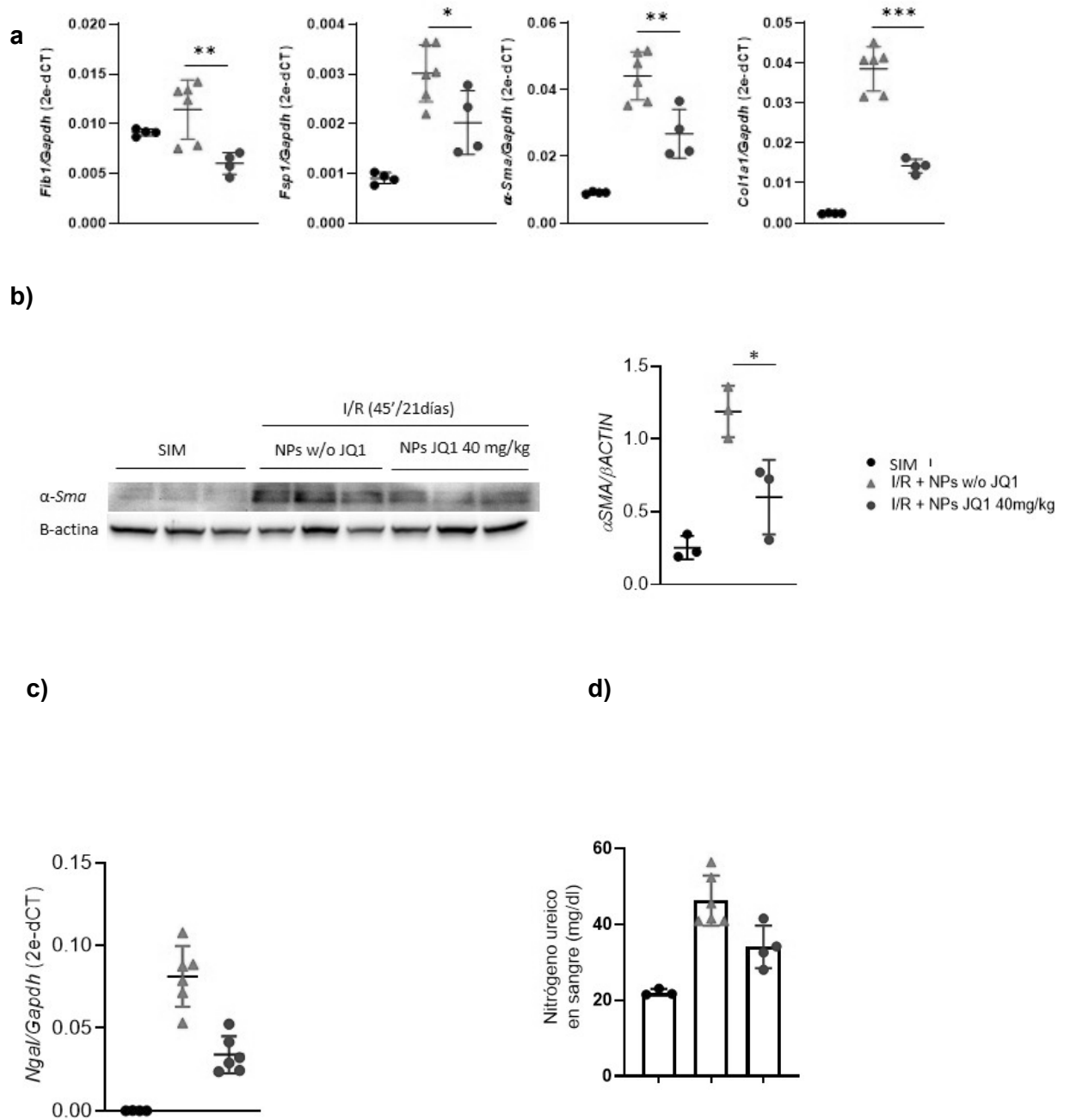


Figura 12





- ②① N.º solicitud: 202330581
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: **A61K9/127** (2006.01)
A61P13/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 114053223 A (SHANGHAI INST MATERIA MEDICA CAS) 18/02/2022	1-20
X	FOURNIOLS, T. et al. Colorectal cancer inhibition by BET inhibitor JQ1 is MYC-independent and not improved by nanoencapsulation. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Febrero 2022, Vol. 171, páginas 39-49. ISSN 0939-6411 (print) ISSN 1873-3441(electronic), <DOI:10.1016/j.ejpb.2021.10.017>. resumen, pag. 40, figura 1	1, 9, 10
A	Febrero 2022, Vol. 171, páginas 39-49. ISSN 0939-6411 (print) ISSN 1873-3441(electronic), <DOI:10.1016/j.ejpb.2021.10.017>. resumen, pag. 40, figura 1	2-8, 11-20
X	ALBERTO, J. et al. Enhanced antitumoral activity of encapsulated bet inhibitors when combined with PARP inhibitors for the treatment of triple-negative breast and ovarian cancers. Cancers. Septiembre 2022, Vol. 14, Nº 18, artículo nº: 4474. ISSN 2072-6694 (electronic), <DOI: 10.3390/cancers14184474>. resumen, paginas 3-5	1
A	Septiembre 2022, Vol. 14, Nº 18, artículo nº: 4474. ISSN 2072-6694 (electronic), <DOI: 10.3390/cancers14184474>. resumen, paginas 3-5	2-20
A	MORGADO-PASCUAL, J. L. et al. Bromodomain and extraterminal proteins as novel epigenetic targets for renal diseases. Frontiers in Pharmacology. Noviembre 2019, Vol. 10, artículo nº: 1315. ISSN 1663-9812 (print) ISSN 1663-9812 (electronic), <DOI:10.3389/fphar.2019.01315>. resumen	21-23
A	SUAREZ-ALVAREZ, B. et al. Inhibition of bromodomain and extraterminal domain family proteins ameliorates experimental renal damage. Journal of the American Society of Nephrology. Febrero 2017, Vol. 28, Nº 2, páginas 504-519. ISSN 1046-6673 (print) ISSN 1533-3450 (electronic), <DOI:10.1681/ASN.2015080910>. resumen	21-23
A	RAYEGO-MATEOS, S. et al. BET protein inhibitor JQ1 modulates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by chronic kidney disease. Antioxidants. Mayo 2023, Vol. 12, Nº 5, artículo nº 1130. ISSN 2076-3921 (print), <DOI:10.3390/antiox12051130>	21-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.03.2024

Examinador
A. I. Santos Díaz

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS