



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 617**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/62** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03747816 .1**

96 Fecha de presentación : **22.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1539976**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54

Título: **Procedimiento para la preparación de partículas polímeras funcionalizadas y biodegradables y a su uso como vehículos para medicamentos.**

30

Prioridad: **30.08.2002 DE 102 40 035**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2011**

73

Titular/es: **Massey University  
Turitea Campus  
Palmerston North, NZ**

72

Inventor/es: **Rehm, Bernd Helmut Adam**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 617 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

Procedimiento para la preparación de partículas polímeras funcionalizadas y biodegradables, y a su uso como vehículos para medicamentos.

Estado de la técnica

- 5 La eficacia de numerosas sustancias activas depende de que sean transportadas exactamente al sitio deseado en el cuerpo del animal, puesto que con frecuencia las sustancias activas solo son capaces de desarrollar su actividad completa en puntos determinados, mientras que en otros puntos no actúan o, incluso, tienen efectos negativos. Este último aspecto es especialmente válido en la lucha de enfermedades cancerosas y, sobre todo, de enfermedades cancerosas que afectan al sistema nervioso central (SNC).
- 10 Un buen ejemplo de las dificultades que surgen en el transporte de sustancias activas en el cuerpo del animal es el que ofrece la barrera hematoencefálica (BHE). Las sustancias activas que tienen su sitio de acción en el SNC deben superar previamente esta barrera. Esta red de vasos sanguíneos y células protege el SNC e impide que puedan penetrar en el SNC sustancias que no sean hidrosolubles. Las sustancias liposolubles pueden atravesar esta barrera sin problemas a través de un sencillo proceso de difusión. Para el transporte de sustancias e iones polares se requieren, por lo general,
- 15 sistemas de transporte activos y pasivos. Dado, sin embargo, que por ejemplo más de 98% de los medicamentos de reciente descubrimiento, cuyo sitio de acción es el SNC, no son hidrosolubles, no pueden atravesar la BHE y, por consiguiente, no pueden alcanzar su sitio de acción.

20 Este ejemplo pone de manifiesto las dificultades que pueden surgir en el transporte de sustancias activas en el organismo animal. En el caso de la BHE se intenta, por ejemplo, hacerla más permeable para las sustancias activas modificando la permeabilidad de la membrana. Por ejemplo, la permeabilidad de la BHE para las sustancias activas se puede lograr elevando artificialmente la presión osmótica o administrando análogos de bradiquinina. Sanovich et al. (Sanovich, E. et al., *Brain Res.* 1995, Vol 705(1-2), pág. 125-135) y otros autores demostraron, por ejemplo, un aumento de la permeabilidad de la BHE para lantano por medio de la administración simultánea con el análogo de bradiquinina RMP-7. Una desventaja fundamental de la apertura de la BHE por uno de los mecanismos anteriormente mencionados es que se produce un aumento de la permeabilidad para todas las sustancias, incluidas por lo tanto las tóxicas, capaces de dañar las células diana en el SNC.

25 Otra posibilidad consiste en modificar químicamente la sustancia activa de tal manera que se convierta en lipófila y pueda atravesar más fácilmente la BHE, tal como se ha demostrado, por ejemplo, para los derivados de clorambucil (Greig, N.H. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990, Vol 25(5), pág. 320-325).

30 El uso de nano- o micropartículas representa una alternativa para los dos sistemas citados anteriormente. Con su empleo no es necesario modificar la permeabilidad ni de la membrana ni de la sustancia activa. Kreuter (Kreuter, J.J., *Anat.* 1996, Vol. 189(3), pág. 503-505) demuestra que las partículas polímeras utilizadas con este fin se pueden preparar esencialmente por procedimientos químicos tales como polimerización por emulsión, polimerización de superficies limítrofes, desolvatación, evaporación y separación de disolvente.

35 Según el documento DE 197 45 950 A1, se utilizan partículas polímeras procedentes de las más diversas sustancias (polímeros (aquí, polibutil-cianoacrilato), lípidos sólidos o líquidos, emulsiones aceite de agua, emulsiones agua/aceite/agua o vesículas de fosfolípidos), que se unen a los medicamentos para transportarlos hasta el SNC.

40 Otro aspecto crítico en el transporte de nano- y micropartículas a través de una membrana y, en especial, la membrana de la BHE, es el tamaño de la partícula polímera. Los resultados de investigaciones realizadas hasta la fecha demuestran que las partículas polímeras con un tamaño de hasta 270 nm pueden superar la BHE (Lockman, P.R. et al., *Drug Develop. Indust. Pharmacy* 2002, Vol. 28(1), pág. 1-12).

45 Por lo tanto, es importante que las partículas polímeras usadas tengan un tamaño determinado. Según Lockman (Lockman, P.R. et al., *Drug Develop. Indust. Pharmacy* 2002, Vol. 28(1), pág. 1-12), el tamaño de las partículas polímeras preparadas de acuerdo con el procedimiento anterior se determina muy a menudo por espectroscopia de correlación de fotones. Esta técnica, basada en el movimiento molecular de Brown, mide la partícula polímera con un rayo láser, en donde se utiliza la dependencia del tiempo de la modificación de la luz para determinar el tamaño de la partícula. Sin embargo, este procedimiento analítico para la determinación adicional del tamaño de la partícula polímera preparado es muy laborioso en cuestión de tiempo y coste.

50 Por lo tanto, misión de la presente invención es poner a disposición un sistema de transporte rápidamente utilizable y de coste asumible para sustancias biológicamente activas, que permita un transporte efectivo y seguro de sustancias activas en el organismo animal.

55 Por "sustancia biológicamente activa" en el sentido de esta invención se entiende toda sustancia capaz de desencadenar en el organismo una reacción biológica. Estas sustancias comprenden tanto enzimas como abzymas, que catalizan una reacción determinada en el organismo, proteínas tales como, por ejemplo, anticuerpos, que generan una reacción indirecta del organismo ante la presencia de esta sustancia en el organismo, así como también moléculas

inorgánicas y orgánicas, que no son de origen biológico, es decir, que no han sido formadas por un organismo de origen natural, sino que han sido preparadas de forma artificial. A este último grupo pertenece también la gran mayoría de las sustancias activas farmacéuticas. Las sustancias biológicamente activas también pueden ser apropiadas, en función de su tipo, para unirse a otras sustancias biológicamente activas.

5 Para resolver la misión anteriormente citada, se pone a punto un procedimiento para preparar partículas polímeras biodegradables. Este procedimiento comprende la incorporación de al menos un gen inducible en un microorganismo, en donde el gen codifica una proteína que controla el tamaño de la partícula polímera, y al menos un gen adicional que codifica una polímero-sintasa, en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que comprende una proteína biológicamente activa, o en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión capaz, además,  
10 de unirse directamente o a través de un agente de acoplamiento con una sustancia biológicamente activa, y el cultivo del microorganismo, bajo la inducción del al menos un gen inducible mencionado anteriormente, en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para la fabricación de la partícula polímera biodegradable por parte del microorganismo. Por medio de este procedimiento resulta posible preparar partículas polímeras biocompatibles y biodegradables, adecuadas para el transporte de sustancias biológicamente activas y que, bajo el control del tamaño de la partícula polímera en formación, se puedan producir partículas polímeras del tamaño requerido. A través de la preparación controlada de partículas polímeras de un tamaño determinado, aumenta el rendimiento de partículas polímeras del tamaño deseado, lo que conduce a una elevación de la eficacia del procedimiento y, simultáneamente, contribuye a reducir costes. Adicionalmente, por medio del procedimiento según la invención es posible preparar partículas polímeras que satisfagan los requisitos ya mencionados de tamaño de partícula para el transporte a través de la BHE. Por medio  
20 de este procedimiento se posible preparar, sobre todo, partículas polímeras que tengan un tamaño menor que el de las partículas polímeras de este tipo, producidas naturalmente por el microorganismo. El tamaño medio de las partículas polímeras producidas naturalmente por los microorganismos es de 300 a 500 nm (Wieczorek, R. et al., *J. Bacteriol.* 1997, Vol. 177(9), pág. 2425-2435), en tanto que el procedimiento según la invención permite controlar la preparación de partículas polímeras de tal forma que su tamaño esté claramente por debajo de este valor medio.

25 La inducción del gen que determina el tamaño de partícula tiene lugar, en este caso, a través de un promotor inducible intercalado tal como, por ejemplo, un promotor BAD, que se induce por arabinosa. Los microorganismos utilizados para ello carecen del gen destinado al control del tamaño de las partículas polímeras, o se inactiva este gen, y se le sustituye por al menos un gen inducible descrito en el procedimiento según la invención, que codifica una proteína capaz de controlar el tamaño de la partícula polímera. En este caso, este gen se incorpora en la célula a través de un vector que se describirá más detalladamente en la sección experimental de esta memoria. De esta forma, resulta posible por primera vez preparar partículas polímeras biodegradables y biocompatibles de un tamaño definido, en un procedimiento microbiano.

35 Estas partículas polímeras se depositan como inclusiones citoplasmáticas en la célula. El núcleo de esta partícula polímera se compone de carboxilatos de polihidroalquilo, en especial polihidroalcanoatos, y está rodeado por una membrana de recubrimiento formada por proteínas y fosfolípidos. La membrana de recubrimiento está compuesta por lípidos y proteínas incluidas en dichos lípidos. Los carboxilatos de polihidroalquilo que forman el núcleo de estas partículas polímeras, tienen puntos de fusión de 50°C hasta 176°C, una cristalinidad de 30% hasta 70% y valores de elongación de rotura de 5% hasta 300%.

40 Para poder aplicar este ventajoso procedimiento también en microorganismos más apropiados para el cultivo biotecnológico (por ejemplo, determinadas formas de *E. coli*, clasificados como organismos GRAS), pero que debido a su dotación genética no son capaces de producir las partículas polímeras anteriormente citadas, además del al menos un gen inducible que codifica una proteína que controla el tamaño de la partícula polímera, se incorpora al menos un gen adicional que codifica una proteína que interviene en la formación de la partícula polímera. Es concebible el uso de cualquier proteína capaz de influir sobre el metabolismo, que conduce a la formación de la partícula polímera y, por lo tanto, sobre la composición de la partícula polímera en formación. Para ello, el al menos un gen adicional que codifica la proteína que interviene en la formación de la partícula polímera, se selecciona de tal manera que codifique una tiolasa, una reductasa o una polímero-sintasa. Por la expresión polímero-sintasa se entiende toda proteína capaz de catalizar la última etapa para la formación de un polímero. Además de las polímero-sintasas descritas en esta invención, la formación de un polímero puede ser asumida también, por ejemplo, por una lipasa. Preferentemente, el al menos un  
45 gen adicional que codifica la proteína que interviene en la formación de la partícula polímera, se selecciona de tal manera que codifique la phaA-tiolasa, la phaB-cetoacil-reductasa o la phaC-sintasa de *Ralstonia eutropha*. A través de la incorporación de estos genes adicionales se modifica adicionalmente la célula de modo que se encuentra en situación de producir proteínas que permiten la formación de partículas polímeras. Por medio de la selección dirigida del al menos un gen adicional que codifica una proteína que interviene en la formación de partículas polímeras, se puede influir igualmente sobre la composición posterior de la partícula polímera. Los genes codificadores de proteínas que intervienen en la vía metabólica para la formación de partículas polímeras, pueden tener diferente especificidad de sustrato, formar diferentes productos de reacción o bloquear desvíos en la vía metabólica, con el fin de influir de manera dirigida sobre los sustratos y moléculas que intervienen en la formación de las partículas polímeras.

60 En microorganismos tales como los mutantes de la especie *E. coli* descritos en el Ejemplo 4, que tienen un metabolismo modificado de los ácidos grasos, se requiere además del al menos un gen inducible que codifica una proteína que controle el tamaño de la partícula polímera, solo la polímero-sintasa para facilitar la preparación de las partículas

- 5 polímeras. En función del organismo utilizado, se pueden incluir en la célula genes adicionales para permitir la creación de partículas polímeras bajo las condiciones establecidas. Si la célula no contiene todos los genes necesarios para la formación de la partícula polímera, aún así puede producirse la preparación de partículas polímeras aportando a la célula a través del medio de nutrición los productos intermedios ausentes que deberían fabricar las proteínas ausentes. No obstante, para la formación de partículas polímeras siempre resulta necesaria al menos una polímero-sintasa.
- 10 Por medio del control de la composición de las partículas polímeras es posible influir sobre sus propiedades. Mediante la influencia sobre sus propiedades se puede actuar, por ejemplo, sobre la velocidad de la biodegradabilidad de la partícula polímera. Además de la posibilidad, ya anteriormente mencionada, de seleccionar de manera dirigida los genes adicionales incorporados en la célula, y que codifican las proteínas que intervienen en la formación de las partículas polímeras, para influir sobre la composición de las partículas polímeras que se forman *in vivo* es preferible incorporar en la célula al menos un gen adicional que codifique una tiolasa y/o una polímero-sintasa. La diferente especificidad de sustrato de las tiolasas y de las polímero-sintasas da lugar a la aparición de diferentes productos intermedios y finales y, por consiguiente, a una diferente composición del núcleo polímero formado de la partícula.
- 15 El principio de preparación de esta partícula polímera se explica más detalladamente en base a la Figura 2. Los precursores activados para la biosíntesis de los polímeros pueden derivar básicamente de los metabolitos centrales acetil-CoA, o de intermedios de las vías metabólicas primarias del ciclo citrato,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, así como del metabolismo de aminoácidos. De este modo, los ácidos grasos actúan como fuentes de carbono, se preparan intermedios (acil-CoA, en especial 3-hidroxiacil-CoA) por la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, que actúan como precursores activados para la biosíntesis de PHA.
- 20 El control del tamaño de partícula se lleva a cabo usando como el al menos un gen inducible que codifica una proteína capaz de controlar el tamaño de la partícula polímera, derivada de la familia de las proteínas similares a fasina, seleccionándolo preferentemente del grupo que comprende el gen de fasina phaP de *Ralstonia eutropha* y el gen de fasina phaF de *Pseudomonas oleovorans*. Las fasinas son proteínas anfífilas con un peso molecular de 14 hasta 28 kDa, que se fijan firmemente a la superficie hidrófoba de la partícula polímera.
- 25 Las partículas polímeras con diferentes composiciones del polímero que las forma exhiben diferentes propiedades mecánicas y liberan de manera diferente las sustancias biológicamente activas, en particular las sustancias activas farmacéuticas. Por ejemplo, las partículas polímeras compuestas por 3-hidroxiácidos grasos C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> muestran, como consecuencia de la baja cristalinidad del polímero una tasa de degradación más elevada del polímero. Habitualmente, el incremento de la proporción molar de los componentes del polímero con grandes cadenas laterales en la estructura central del polímero, reduce la cristalinidad y conduce a propiedades elastómeras aumentadas. A través del control de la composición polímera según el procedimiento descrito en la presente memoria es posible influir sobre la biodegradabilidad de las partículas polímeras y, por lo tanto, también sobre la velocidad de liberación de las sustancias biológicamente activas, especialmente sustancias activas farmacéuticas.
- 30 Preferentemente, en el medio de cultivo se incorpora como sustrato para la formación de las partículas polímeras al menos un ácido graso con grupos laterales funcionales y, de forma especialmente preferida, al menos un hidroxiácido graso y/o al menos un mercapto-ácido graso y/o al menos un  $\beta$ -amino-ácido graso. Por "ácidos grasos con grupos laterales funcionales" se entienden ácidos grasos saturados o insaturados. A los mismos pertenecen los ácidos grasos que contienen grupos laterales funcionales seleccionados del grupo que comprende grupos metilo, grupos alquilo, grupos hidroxilo, grupos fenilo, grupos sulfhidrilo, grupos amina primaria, secundaria y terciaria, grupos aldehído, grupos ceto, grupos éter, grupos carboxilo, grupos ésteres O, grupos tioéster, grupos ácido carboxílico-amido, grupos semiacetal, grupos acetal, grupos fosfato-monoéster y grupos fosfato-diéster.
- 35 El uso de sustratos está determinado por la composición deseada y las propiedades esperadas de la partícula polímera, lo que está influido tanto genéticamente por el uso de distintos genes que codifican proteínas con diferentes especificidades de sustrato, como también por los aditivos, sustratos y condiciones de reacción que se emplean en el medio de cultivo.
- 40 Con el objeto de lograr un control más preciso del tamaño de las partículas polímeras en formación, el sustrato que se agrega al medio de cultivo en cantidades suficientemente ajustadas para garantizar el control del tamaño de las partículas polímeras. De este modo, se obtiene la posibilidad adicional de controlar de manera todavía más eficaz de regular el tamaño de partícula.
- 45 Para la formación de las partículas polímeras de acuerdo con el procedimiento según la invención, se selecciona el microorganismo a utilizar entre las especies que comprenden *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Halobiforma*. Preferentemente, el microorganismo utilizado se selecciona del grupo que comprende *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Halobiforma haloterrestis*. Este grupo incluye tanto microorganismos que, de manera natural están en situación de producir partículas polímeras biocompatibles y biodegradables, como microorganismos, tales como *E. coli*, que a causa de su dotación genética no lo están. En los microorganismos mencionados en último lugar, se incorporan los genes necesarios según el procedimiento según la invención para hacer posible la producción de las partículas polímeras. En principio, por medio del procedimiento descrito anteriormente se puede utilizar cualquier

microorganismo cultivable para la fabricación de partículas polímeras, aun cuando no sea capaz de preparar los sustratos necesarios para la formación de partículas polímeras debido a un metabolismo diferente. En tales casos, se agregan los sustratos requeridos al medio de cultivo que, seguidamente, serán transformados en partículas polímeras por las proteínas, expresadas a partir de los genes que se han incorporado en la célula.

- 5 Para obtener las partículas polímeras a partir de las células, se desintegran los microorganismos cultivados de manera en sí conocida y, a continuación, se separan las partículas polímeras de los restos celulares. Para ajustar todavía más el intervalo de tamaño de las partículas polímeras obtenidas de este modo, se pueden aplicar procedimientos estándares tales como, por ejemplo, cromatografía de exclusión o una centrifugación por gradiente de densidad, para seleccionar las partículas polímeras del tamaño deseado.
- 10 Del mismo modo, se puede modificar la membrana de recubrimiento – formada por proteínas y lípidos – de las partículas polímeras preparadas según la invención, con el fin de proporcionar a las partículas propiedades más favorables para el transporte de las sustancias activas en el organismo animal. Para ello, en las partículas polímeras preparadas por el procedimiento según la invención se separa una capa lipídica que se encuentra sobre la superficie de la partícula polímera, que se sustituye por otra capa lipídica de diferente composición.
- 15 En la sustitución de una capa lipídica por otra de distinta composición, las propiedades de la nueva capa lipídica, que influyen sobre el transporte de la partícula polímera a través de una membrana biológica, son de importancia. Cuando la capa lipídica de la membrana de recubrimiento coincide con la capa lipídica de la membrana diana, se puede observar una mejor incorporación de las partículas (Fernart, L. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, Vol. 291(3), pág. 1017-1022). Por esta razón, es posible retirar la capa lipídica de la partícula polímera y sustituirla con una capa lipídica de diferente composición. Esto se lleva a cabo, preferentemente, por una extracción con acetona, o bien de utilizan fosfolipasas o detergentes no desnaturizantes. A continuación, se agrega a las partículas polímeras prácticamente exentas de lípidos una mezcla de las correspondientes moléculas anfífilas para obtener una capa lipídica con la composición deseada. De este modo, la nueva capa lipídica está compuesta, preferentemente, por una mezcla de moléculas anfífilas seleccionadas del grupo que comprende fosfolípidos y éter-lípidos.
- 20
- 25 Por medio del uso de los detergentes mencionados anteriormente es posible separar, además de los lípidos, también las proteínas que se encuentran en la superficie de las partículas polímeras, hasta la polímero-sintasa, sustituyéndolas por proteínas funcionalizadas. De esta forma, se pueden preparar partículas polímeras desnudas disponibles para una serie de modificaciones posibles, que se describirán más adelante. Para este tipo de modificaciones resultan especialmente apropiadas las partículas polímeras obtenidas a partir del microorganismo *H. haloterrestis*.
- 30 En función de la aplicación posterior de la partícula polímera, el tamaño de partícula se controla a través del al menos un gen inducible de tal forma que las partículas polímeras generadas tengan un diámetro de 10 nm hasta 3  $\mu\text{m}$ , preferentemente 1 nm hasta 900 nm y, de manera especialmente preferida, de 10 nm hasta 100 nm. En una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, este control de tamaño se puede alcanzar también por la regulación de la disponibilidad de un sustrato en el medio de cultivo, o por una combinación de los dos mecanismos citados.
- 35
- 40 Para la funcionalización de las partículas polímeras preparadas por el procedimiento según la invención es necesario que el al menos un gen inducible, incorporado en el curso del procedimiento, que codifica una proteína responsable de controlar el tamaño de la partícula polímera, comprenda un dominio de fijación de la partícula polímera y al menos un dominio de fijación, en donde este último sea capaz de unirse a una sustancia biológicamente activa y/o a un reactivo de acoplamiento. Así mismo, es especialmente preferido que el al menos un gen adicional, que codifica una proteína que interviene en la formación de las partículas polímeras, comprenda un dominio de fijación de la partícula polímera y por lo menos un dominio de fijación, en donde este último dominio de fijación sea capaz de unirse a una sustancia biológicamente activa y/o a un reactivo de acoplamiento.
- 45
- 50 Un “dominio de fijación” designa la parte de la proteína que contiene el al menos un gen inducible previamente incorporado por modificación genética en la célula y/o el al menos un gen adicional, que codifica la proteína responsable de la formación de las partículas polímeras. Los dominios de fijación que pueden unirse a sustancias biológicamente activas y/o a reactivos de acoplamiento, se seleccionan del grupo que comprende oligopéptidos, enzimas, abzimas y proteínas no catalíticas. De manera preferente, este grupo comprende epítomos FLAG o al menos una cisteína. Estos grupos se designan en la parte experimental también como proteínas funcionales. La secuencia de codificación de los miembros citados en estos grupos se debe incorporar en la secuencia codificadora del al menos un gen inducible incorporado previamente en la célula y/o del al menos un gen adicional que codifica la proteína que interviene en la formación de partículas polímeras. De este modo, se producen proteínas que no solo participan en la formación o en el control de la formación de partículas polímeras, sino que a través de sus dominios de fijación generados por modificación genética, son capaces de unirse a sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento. Los dominios de fijación también se pueden obtener después de la preparación de las partículas polímeras por modificación química de las proteínas localizadas en la superficie con ayuda de reactivos de acoplamiento (véase el Ejemplo 8).
- 55

En este sentido, un “reactivo de acoplamiento” es un compuesto inorgánico u orgánico que es apropiado para unirse, por un lado, a una sustancia biológicamente activa o a otros reactivos de acoplamiento, y por el otro lado, a los dominios de fijación.

Esta estructura hace posible preparar partículas polímeras multifuncionales, apropiadas para el transporte de sustancias biológicamente activas. El “dominio de fijación de la partícula polímera” está compuesto, preferentemente, por una parte de una proteína que, además, es capaz de unirse a la superficie hidrófoba de la partícula polímera. Los dominios de partículas polímeras que comprenden una parte de una proteína unida a la superficie de la partícula polímera, se seleccionan del grupo de proteínas que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímeros, una polímero-sintasa y una proteína que controla el tamaño de partícula. Estas proteínas proceden, preferentemente, de microorganismos capaces de formar partículas polímeras, en especial de los microorganismos de las especies *Ralstonia*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*. La proteína responsable del control del tamaño de la partícula proviene, preferentemente, de proteínas similares a fasina y, de forma más preferida, se utiliza la fasina de *R. eutropha* y *P. oleovorans*.

Un “regulador de polímero” en el sentido de la invención es una proteína que regula la transcripción de los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* que intervienen en la formación de las partículas polímeras. Se retira por la unión a la superficie de la partícula de la regulación de transcripción. Un ejemplo de un regulador de este tipo es el represor de fasina (*phaR*) de *R. eutropha*, que se une a un promotor de un gen similar a la fasina, cuyo producto de expresión regula el tamaño de la partícula polímera en formación e impide que el gen sea desestimado. Por medio de una unión del represor de fasina a la superficie de las partículas polímeras en formación, este punto queda liberado en el promotor y se puede iniciar la transcripción del gen situado inmediatamente detrás.

El beneficio de los dominios de fijación de una polímero-sintasa para la unión de reactivos de acoplamiento y/o sustancias biológicamente activas deriva de la elevada estabilidad de la unión entre el dominio de fijación de la partícula polímera de esta proteína y el núcleo de la partícula polímera. Sorprendentemente, los inventores han encontrado que esta unión al núcleo de la partícula polímera biodegradable no puede ser destruida ni por reactivos desnaturizantes tales como, por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS), urea, hidrócloruro de guanidina o ditiotreitól, ni mediante el empleo de condiciones ácidas. Preferentemente, se utiliza a tal efecto la polímero-sintasa derivada de *R. eutropha*, *P. oleovorans*, *P. putida* o *P. aeruginosa*.

Una ventaja especial del procedimiento según la invención es que las modificaciones técnicas genéticas llevadas a cabo sobre las proteínas que se unen a la superficie de las partículas polímeras no influyen sobre la funcionalidad de las proteínas que intervienen en la formación de las partículas polímeras. Así, por ejemplo, se conserva la funcionalidad de la polímero-sintasa cuando se fusiona a través de su extremo N-terminal con una proteína y genera de esta forma un dominio de fijación para la unión de sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento. Aun en el caso de que la funcionalidad de una proteína se viera afectada por la fusión, este déficit se podría compensar por la presencia de un gen adicional, que codifique una proteína que lleve a cabo la misma función y que esté presente en estado activo.

De este modo, resulta posible garantizar una unión estable de las sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento a la partícula polímera a través de los dominios de fijación de las proteínas, en particular de la polímero-sintasa.

Entre los genes modificados genéticamente que codifican proteínas que, tras su expresión, se unen a la superficie de las partículas, se pueden incorporar a la célula también genes con diferentes modificaciones. Después de la expresión de estas proteínas con sus diferentes dominios de fijación y la formación de las partículas polímeras, se puede llevar a cabo una multifuncionalización de la superficie de las partículas a través de los diferentes dominios de fijación. Con la ayuda de este procedimiento resulta posible una producción masiva sencilla y eficiente de partículas polímeras funcionalizadas.

Para la funcionalización ulterior de las proteínas unidas a la superficie de las partículas polímeras se utilizan reactivos de acoplamiento, seleccionados preferentemente del grupo que comprende cloruro de bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfona (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBroP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBOP), N-hidroxi-succinimida-biotina, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), dicitclohexil-carbodiimida, carbonato de disuccinimidilo, 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC), bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfina, diisopropil-carbodiimida (DIPC), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazolil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboxiimido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), cloroformiato de para-nitrofenilo y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).

Como sustancias biológicamente activas se utilizan, preferentemente, pesticidas, herbicidas, sustancias farmacológicamente activas y proteínas.

Las sustancias farmacológicamente activas se seleccionan del grupo que comprende dideoxiinosina, floxuridina, 6-mercaptopurina, doxorubicina, daunorubicina, 1-darubicina, cisplatino, metotrexato, taxol, antibióticos, anticoagulantes, germicidas, agentes antiarrítmicos y precursores y derivados de sustancias activas de los citados grupos de sustancias activas.

Las proteínas se seleccionan preferentemente del grupo que comprende insulina, calcitonina, ACTH, glucagón, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, factores de liberación del

hipotálamo, prolactina, hormona estimulante del tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresinas, opiáceos de origen no natural, superóxido-dismutasa, anticuerpos, interferones, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, tripsina, quimotripsina y pepsina.

5 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación *in vitro* de partículas polímeras biodegradables, en donde el procedimiento comprende la disposición de una solución adecuada para la formación de partículas polímeras con al menos un sustrato, la incorporación de una proteína a la solución que es apropiada para controlar el tamaño de la partícula polímera, y la inclusión de al menos una proteína adicional, que interviene en la formación de las partículas polímeras. El procedimiento *in vitro* también ofrece la ventaja de poder regular el tamaño de la partícula polímera ya durante su fabricación, evitando de este modo la necesidad de determinar posteriormente el tamaño y la separación de las partículas polímeras formadas de acuerdo con sus tamaños, con el ahorro de tiempo y dinero que ello conlleva.

10 En este caso, la al menos una proteína adicional utilizada, que interviene en la formación de las partículas polímeras, es una polímero-sintasa, en donde la polímero-sintasa es una proteína de fusión que comprende una proteína biológicamente activa, o en donde la polímero-sintasa es una proteína de fusión capaz de unirse directamente, o a través de un agente de acoplamiento, a una sustancia biológicamente activa; esta polímero-sintasa se selecciona, preferentemente, del grupo que comprende las polímero-sintasas de *R. eutropha*, *P. oleovorans*, *P. putida* y *P. aeruginosa*.

15 Al contrario que la síntesis *in vivo*, la síntesis *in vitro*, en la que se utilizan proteínas y enzimas aisladas de microorganismos en el laboratorio, tiene normalmente un coste muy elevado, dado que tanto las enzimas como en parte también los sustratos enzimáticos deben ser aislados y purificados previamente. En una forma de realización especial de la presente invención para la síntesis *in vitro* de partículas polímeras biocompatibles y biodegradables, la solución adecuada para la formación de partículas polímeras contiene al menos un ácido graso, de forma especialmente preferida un  $\beta$ -mercapto-ácido y/o un  $\beta$ -aminoácido graso y una acil-CoA oxidasa, u otras enzimas oxidantes y activadoras para la formación de las partículas polímeras. Por medio del uso de estos sustratos, en lugar de los 3-hidroxiácidos grasos R/S y de la acil-CoA-sintetasa, se forma un sistema de reciclaje de CoA, en el que la acil-CoA oxidasa activará y oxidará los ácidos grasos, mientras consume CoA e hidroliza ATP. Durante la polimerización, la polímero-sintasa CoA se divide, de modo que puede ser reutilizada por la acil-CoA oxidasa. De esta forma, los costes de este procedimiento *in vitro* se pueden reducir de manera destacada.

20 Una ventaja adicional del procedimiento *in vitro* para preparar partículas polímeras es que el al menos un sustrato de la solución apropiada para la formación de partículas polímeras se agrega en una cantidad tal que puede ser suficientemente regulada para garantizar el control del tamaño de las partículas polímeras.

25 Adicionalmente, el tamaño de las partículas polímeras en formación se puede controlar también agregando la polímero-sintasa a la solución en una cantidad tal que sea suficiente para garantizar el control del tamaño de las partículas polímeras en formación. Al igual que en el procedimiento *in vivo*, en el procedimiento *in vitro* existen también posibilidades adicionales de regular de manera más precisa el control de tamaño de las partículas polímeras y aumentar, de este modo, el rendimiento de partículas polímeras del tamaño deseado y, por lo tanto, aplicar este procedimiento de forma más eficiente y económicamente beneficiosa.

30 De forma general, el auténtico control de tamaño de partícula tiene lugar en el procedimiento *in vitro* por la incorporación en la solución de una proteína que controla el tamaño de la partícula polímera, derivada de la familia de proteínas similares a lasina y seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende la lasina de *Ralstonia eutropha* y la lasina de *Pseudomonas oleovorans*.

35 Por la selección de al menos un sustrato, así como de la enzima utilizada es posible, al igual que en el procedimiento *in vivo*, regular la composición del polímero y obtener de este modo núcleos polímeros con diferentes propiedades. Utilizando más de un sustrato, se pueden obtener, por ejemplo, en función del tipo de polímeros formados a partir de enzimas, partículas polímeras con diferentes composiciones del núcleo polímero. Tal como se ha descrito anteriormente, los polímeros fabricados de esta forma proporcionan diferentes propiedades a las partículas polímeras.

40 En el procedimiento *in vitro* para la fabricación de partículas polímeras se agrega a la solución, para controlar la composición de la capa lipídica en la superficie de la partícula polímera, al menos una molécula anfífila seleccionada del grupo de fosfolípidos y éter-lípidos (sin la adición de moléculas anfífilas adicionales se obtienen partículas *in vitro* que están recubiertas solamente con proteínas, lo que representa un tipo adicional de partícula). De esta forma, es posible preparar, por ejemplo, partículas polímeras con una carga superficial específica, especialmente apropiada para la membrana biológica que deberá superar posteriormente en el organismo animal. La ventaja de la modificación de la capa lipídica de la membrana de recubrimiento en el procedimiento *in vitro* es que desaparece la ulterior modificación de la capa lipídica que sí tiene lugar en el procedimiento *in vivo*. Dado que las moléculas anfífilas tales como, por ejemplo, fosfolípidos y éter-lípidos, se agregan ya a la solución inicial, se genera ya desde el comienzo una capa lipídica con la composición deseada.

45 Otro aspecto del procedimiento *in vitro*, que también se aplica en el procedimiento *in vivo*, es que a la solución adecuada para la formación de partículas polímeras se agrega al menos una sustancia farmacéuticamente activa. Esta

5 se incluye durante la síntesis de las partículas polímeras en la partícula polímera y puede ser liberada posteriormente en el organismo animal por difusión, a través de la matriz de la partícula, o por degradación de la partícula polímera. Esta última variante tiene la ventaja adicional, en las partículas polímeras producidas por el procedimiento según la invención, de que se puede regular la velocidad de la degradación biológica de la partícula polímera a través del control anteriormente descrito de la composición del núcleo polímero. De esta forma, resulta posible liberar de manera continua la sustancia activa durante un periodo de tiempo determinado.

10 Además de la incorporación de sustancias activas en las partículas polímeras en crecimiento, se lleva a cabo la funcionalización, como sucede también en el procedimiento *in vivo*, seleccionando al menos una de las proteínas que se agregan a la solución apropiada para la formación de partículas polímeras, de modo que la al menos una proteína comprenda un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, en donde el al menos un dominio de fijación pueda unirse a una sustancia biológicamente activa y/o a un reactivo de acoplamiento. Las proteínas utilizadas en este caso para la formación de partículas polímeras en el procedimiento *in vitro* se pueden obtener del procedimiento *in vivo* descrito anteriormente y reflejan, en función del tipo de producción descrito más arriba, las correspondientes propiedades. A continuación, se agregan a la solución apropiada para la formación de partículas polímeras y participan en la generación de dichas partículas polímeras. Al igual que en el procedimiento *in vivo*, las partículas polímeras preparadas de esta manera también se pueden someter a posteriores modificaciones con los reactivos de acoplamiento que ya se han descrito anteriormente, o por medio de la adición de sustancias biológicamente activas, que se unen a los dominios de fijación de las proteínas que están fijados a la superficie de las partículas polímeras.

20 Adicionalmente, la invención comprende una partícula polímera con un tamaño definido, con una capa superficial formada por moléculas anfífilas y al menos una polímero-sintasa, que es una proteína de fusión, que incluye una proteína biológicamente activa, o en donde la polímero-sintasa es una proteína de fusión capaz de unirse directamente, o a través de un agente de acoplamiento, a una sustancia biológicamente activa, en donde la al menos una proteína se selecciona del grupo que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímero, una polímero-sintasa y una proteína que influye sobre el tamaño de la partícula, en donde la al menos una proteína comprende un dominio de fijación de partículas polímeras y un dominio de fijación, que se puede unir a una sustancia biológicamente activa y/o un reactivo de acoplamiento, y que, en una forma de realización preferida, se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

30 Debido a sus ventajosas propiedades, las partículas polímeras de la presente invención son apropiadas, en particular, para la preparación de un medicamento, un pesticida o un herbicida, en donde el medicamento es adecuado, preferentemente, para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. A través de las posibilidades de modificación descritas en el presente procedimiento de las partículas polímeras, se logran las condiciones para superar la BHE.

35 Los controles del tamaño de partícula, el ajuste de la composición de la membrana de recubrimiento y, en particular, también la funcionalización de la superficie de la partícula, hacen de estas partículas polímeras biodegradables un vehículo de transporte apropiado para sustancias biológicamente activas de cualquier clase y, permiten, además, un transporte dirigido de las partículas polímeras hasta su punto de acción. La multifuncionalización permite, por ejemplo, la fijación simultánea de al menos una sustancia farmacéuticamente activa a la superficie de la partícula, así como la de un anticuerpo que, debido a su especificidad de unión, permite un direccionamiento exacto hacia el punto de acción. Estas y otras ventajas se explicarán más detalladamente por medio de los siguientes ejemplos de realización.

#### Descripción de las Figuras

Figura 1 es una representación esquemática de una partícula polímera biodegradable, preparada *in vivo*, y de las proteínas y lípidos que están unidos a la superficie. En este caso, las abreviaturas hacen referencia a las siguientes proteínas:

45 A: Polímero-depolimerasa

B: Fasina (Nombre del gen codificador en *R. eutropha*: phaP, en *P. oleovorans*: phaF)

C: Polímero-sintasa

D: Fosfolípido

E: Reguladores del polímero (por ejemplo, el represor de fasina (PhaR de *R. eutropha*))

50 Figura 2 representa en forma de ejemplo la síntesis de uno de los posibles polímeros biodegradables en *R. eutropha*. El polihidroxialcanoato sencillo ácido polihidroxibutírico (PHB) se prepara a partir del sustrato acetil-CoA por un proceso de tres etapas. La unidad C4 repetida en PHB es el ácido  $\beta$ -hidroxibutírico. El último paso de la síntesis conduce a la formación de la partícula polímera, sobre cuya superficie se encuentra fijada la polímero-sintasa.

55 Figuras 3 y 4 representan los resultados de los experimentos *in vivo*. La Figura 3 describe, en este sentido, el comportamiento del diámetro de las partículas polímeras frente a un aumento de la expresión de fasina (aumento de la

cantidad de inductor en la solución), en tanto que la Figura 4 representa el comportamiento del número de partículas polímeras en la célula frente a un incremento de la expresión de fasina (aumento de la cantidad de inductor en la solución).

5 Figuras 5 y 6 representan los resultados de los experimentos *in vitro*. La Figura 5 describe la influencia de la proporción cuantitativa de fasina con respecto a la polímero-sintasa sobre el diámetro de las partículas polímeras, en tanto que la Figura 6 muestra la influencia de la proporción del sustrato con respecto a la polímero-sintasa sobre el diámetro de las partículas polímeras.

10 Figura 7 representa el vector pBBad22K (Sukchawalit, R. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1999, Vol. 181(2), pág. 217-223), que se utiliza como plásmido de partida para la construcción de los plásmidos pBBad-P (portador del gen *phaP* de *R. eutropha*) y pBBad-F (portador del gen *phaF* de *P. oleovorans*).

Figura 8 representa el vector pBBad-P, portador del gen *phaP* para la expresión de la proteína fasina de *R. eutropha*, responsable de la determinación del tamaño de partícula.

15 Figura 9 representa el plásmido pBHR68, que media en el almacenamiento del polímero (ácido polihidroxibutírico) (Spiekermann, P. et al., *Arch. Microbiol.* 1999, Vol. 171, pág. 73-80), que es portador de los genes *phB<sub>Re</sub>*, *phA<sub>Re</sub>* y *phbC<sub>Re</sub>* de *Ralstonia eutropha*, que constituyen el operón de la biosíntesis para la expresión de la *phaA*-tiolasa, *phaB*-cetoacil-reductasa, y de la *phaC*-sintasa.

Figura 10 representa el plásmido pBHR71, que media en el almacenamiento del polímero (polihidroxialcanoatos) (Langenbach, S. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1997, Vol. 150, pág. 303-309), que es portador del gen *phaC1* para la expresión de la polímero-sintasa.

20 Figura 11 representa el vector pBBad-F, que es portador del gen *phaF* para la expresión de la proteína similar a fasina, que determina el tamaño de la partícula, de *P. oleovorans*.

25 Figura 12 representa el vector pBHR71-Cys, que se construye a partir del plásmido pBHR71 de la Figura 10. El gen *phaC1*, que codifica la polímero-sintasa, porta en esta construcción dos restos cisteína en el extremo N-terminal para permitir la unión directa de sustancias biológicamente activas, o la conexión de sustancias biológicamente activas a través de agentes de acoplamiento.

30 Figura 13 representó el vector pBHR71-FLAG, construido igualmente a partir del plásmido pBHR71 de la Figura 10. El gen *phaC1*, que codifica la polímero-sintasa, porta en esta construcción dos epítomos FLAG en el extremo N-terminal. Esto permite tanto *in vivo* la incorporación de secuencias génicas para proteínas funcionales a través de la interfaz Spel en el interior de la secuencia génica de FLAG, como también la unión de reactivos de acoplamiento y/o sustancias biológicamente activas *in vitro* a la polímero-sintasa ya expresada. Las sustancias biológicamente activas, que se fijan directamente o a través de reactivos de acoplamiento, median en la unión al punto de acción (por ejemplo, la superficie celular) o una actividad biológica, en particular una actividad enzimática.

#### Ejemplo 1. Control del tamaño de las partículas polímeras biodegradables preparadas *in vivo*

##### Ejemplo 1.1. Preparación de partículas polímeras en *R. eutropha*

35 Para la producción de partículas polímeras biodegradables se utiliza un mutante “*knock-out*” de *Ralstonia eutropha* (anteriormente, *Alcaligenes eutropha*), York et al. (York, G.M. et al., *J. Bacteriol.* 2001, Vol. 183, pág. 4217-4226) que, en relación con el gen que codifica la expresión de la proteína superficial fasina sobre las partículas polímeras, exhibe un defecto (*phaP*(-)), debido al cual el organismo ya no es capaz de expresar la fasina codificada por el gen *phaP*. Adicionalmente, para la fabricación de las partículas polímeras biodegradables se pueden utilizar también microorganismos que no contienen este gen ni los restantes genes necesarios para la biosíntesis de partículas polímeras. Ejemplos de estos microorganismos son *Escherichia coli* y *Halobiforma haloterrestis*. En un ejemplo de realización, se usa *Escherichia coli* (véase el Ejemplo 2) que, de forma natural, no es capaz de producir las partículas polímeras biodegradables anteriormente descritas.

45 Los microorganismos mencionados en último lugar se transforman entonces con un vector que, en el caso de *R. eutropha* el gen *phaP*, que codifica fasina y que contiene la secuencia promotora. Este gen es inducido por un promotor inducible, preferentemente controla un promotor BAD, que es inducido a través de arabinosa.

##### Etapas de clonación

50 Para la clonación se utiliza la secuencia codificadora de ADN de *phaP* de *R. eutropha*, registrado en el banco de datos “GenBank” con el número AF079155 (Hanley, S.Z. et al., *FEBS Letter* 1999, Vol. 447, pág. 99-105). Este se inserta en la interfaz NcoI/BamHI del vector pBBad22K (Sukchawalit, R. et al., *FEMS Microbiol. Lett* 1999, Vol. 181(2), pág. 217-223, véase también la Fig. 7), que contiene un promotor inducible (P<sub>BAD</sub>). Para la clonación se insertan las correspondientes interfaces de restricción NcoI y BamHI a través de mutagénesis por PCR a través del cebador 5'-aaaggcccatggctctcaccgccgaaca-3' (SEC ID NO: 1, la interfaz NcoI aparece en negrita) y 5'-aaaggccggatcctcagggcactacctcatcg-3' (SEC ID NO: 2, la interfaz BamHI aparece en negrita) en la secuencia de

codificación de fasina. El fragmento de ADN obtenido de este modo, SEC ID NO: 3, se hidroliza con las enzimas de restricción NcoI y BamHI y se liga en el vector pBBad22K (Fig. 7) que está también hidrolizado. El plásmido que contiene ahora la secuencia nucleotídica para la proteína fasina se designa en lo sucesivo como pBBad-P (Fig. 8). Este plásmido se transfiere al microorganismo por medio de técnicas de transformación descritas en el estado de la técnica para el organismo correspondiente. El inductor del promotor BAD de pBBad-P es arabinosa, que hace posible controlar cuantitativamente la expresión de este gen en los microorganismos usados. Por medio de esta posibilidad de ajuste se controla la expresión del gen de fasina y, en último término, el tamaño de la partícula polímera por la cantidad de fasina presente en la célula.

#### Ejemplo 1.2: Generación de microorganismos para la preparación de partículas polímeras, originalmente incapaces de formar partículas polímeras.

En el caso de microorganismos que, originalmente, no están capacitados para formar partículas polímeras de este tipo, un vector adicional o ese mismo vector contiene genes adicionales que intervienen en la formación de partículas polímeras. El tipo y número de los genes necesarios, que se deben incorporar para producir partículas polímeras en un organismo microbiano, se determinan en función de la dotación básica del organismo utilizado. En el caso más sencillo, por ejemplo para *E. coli*, se necesitan al menos una tiolasa, una reductasa y una polímero-sintasa para preparar partículas polímeras por la vía descrita en la Figura 2. Si se emplean organismos que exhiben mutaciones específicas tal como, por ejemplo, la cepa de *E. coli* del Ejemplo 4, resultan suficientes también menos genes que los citados anteriormente para permitir la preparación de partículas polímeras. Lo mismo es válido cuando en el organismo ya hay disponibles determinados sustratos precursores procedentes del metabolismo de la síntesis de polímeros.

En caso de utilizar un plásmido adicional para incorporar en la célula los genes necesarios para la formación de partículas polímeras, resulta especialmente adecuado el plásmido pBHR68 (Fig. 9), que contiene el fragmento SmaI/EcoRI procedente del ADN cromosómico de *R. eutropha*. Esta plásmido contiene el operón de biosíntesis para la preparación de las partículas polímeras biodegradables de *R. eutropha* (Spiekermann, P. et al., *Arch. Microbiol.* 1999, Vol. 171, pág. 73-80).

#### Ejemplo 1.3: Control del tamaño de partícula a través del vector pBBad-P

Los microorganismos modificados de este modo se incuban a 30° en medio Caldo de Luria. La inducción del promotor con arabinosa tiene lugar en la fase de crecimiento logarítmica tardía. 24 h después de la incubación, se determina el tamaño de la partícula en las células. A tal efecto, se separan las células del medio de cultivo por centrifugación y se someten a desintegración. Seguidamente, se lleva a cabo la determinación microscópica del tamaño de las partículas polímeras con ayuda de un microscopio electrónico de efecto túnel en combinación con una cromatografía analítica de filtración sobre gel. Para determinar el número de partículas polímeras, se analizan las células intactas con un microscopio óptico y se realiza el recuento de partículas polímeras/células.

Tal como muestran los resultados, por medio del control de expresión es posible dirigir tanto el tamaño medio de las partículas polímeras formadas (véase la Fig. 3) como también el número medio (véase la Fig. 4) en las células aisladas. A través de la elevación controlada del número de copias de fasina se produce una reducción del diámetro medio de las partículas polímeras, con un incremento simultáneo del número medio de partículas polímeras. De esta manera, se puede incrementar claramente el rendimiento de partículas polímeras con el diámetro deseado. Esto permite una producción rápida y económicamente favorable de partículas polímeras.

#### Ejemplo 1.3: Control del tamaño de partícula a través de la disponibilidad de sustratos

Un mecanismo adicional para controlar el tamaño de las partículas polímeras es la regulación de la disponibilidad de los sustratos o de la polímero-sintasa necesarios para la síntesis de las partículas polímeras. La disponibilidad de la polímero-sintasa se puede controlar en el medio de nutrición por medio de tecnología antisentido, por regulación genética o por la disponibilidad de los sustratos que se requieren para la formación de la polímero-sintasa.

Como ejemplo de una regulación del tamaño de partícula a través de la disponibilidad de un sustrato en el medio nutritivo, se puede citar un experimento en el que se reduce la concentración de la fuente de carbono presente con el fin de regular el diámetro de las partículas polímeras formadas. Para ello, se cultiva una cepa de *E. coli*, que contiene el plásmido ya anteriormente citado pBHR68 (Fig. 9) con el operón de biosíntesis para la producción de partículas polímeras biodegradables a partir de *R. eutropha* (Fig. 8), en medio M9 con 1,5 (p/v) de glucosa a 30°C. Al comienzo de la fase de crecimiento estacionario se reduce la concentración de la fuente de carbono a 1/50 de su valor original, mediante la adición de medio M9 sin glucosa, y los microorganismos se incuban bajo condiciones de crecimiento por lo demás constantes durante 20 h adicionales. Tras finalizar el ensayo, los microorganismos contienen partículas polímeras con un diámetro medio de 130 nm.

#### Ejemplo 2. Influencia de la composición de las partículas polímeras producidas *in vivo*

Para modificar la composición de las partículas polímeras biodegradables, se pueden incorporar en la célula, además del gen que codifica phaP, otros genes que codifican enzimas que ponen a punto los sustratos para la síntesis, en especial tiolosas u otras polímero-sintasas. De este modo, la célula es capaz de incorporar, durante la formación de las

partículas polímeras, una serie de diversos monómeros en la cadena polímera en desarrollo, produciendo así partículas polímeras cuyos núcleos están compuestos por polímeros de diferente composición.

Como ejemplos se muestran aquí diferentes polímero-sintasas que, en base a su especificidad de sustrato, incorporan en los procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro* diferentes 3-hidroxiácidos grasos (C<sub>4</sub>-C<sub>16</sub>) en la cadena polímera en crecimiento. En este caso, se pueden utilizar las polímero-sintasas de *R. eutropha*, que producen cadenas polímeras biodegradables a partir de ácidos grasos C<sub>4</sub> (C4), polímero-sintasas de *Aeromonas punctata* (C4 y C6), *Thiocapsa pfennigii* (C4 y C8) y *P. aeruginosa* (C6 hasta C14). Del mismo modo, la incorporación simultánea de múltiples polímero-sintasas en la célula permite producir partículas polímeras con propiedades diferentes. En un contexto adicional, se pueden obtener también nuevas polímero-sintasas por mutagénesis aleatoria (evolución *in vitro*) con especificidades de sustrato modificadas.

Existe la posibilidad de influir sobre la composición de las partículas polímeras en formación también por otras vías. La preparación de diferentes fuentes de carbono, precursores de distintas fuentes de carbono e intermedios de las vías metabólicas, que conducen a la formación de partículas polímeras, influyen igualmente sobre el tipo de polímero en desarrollo. Adicionalmente, es posible controlar las vías metabólicas que intervienen en la formación de partículas polímeras por medio de inhibidores, uso de mutantes "knock-out" de las vías metabólicas afectadas, y la expresión de enzimas que conducen en la vía metabólica a la formación de productos intermedios o finales.

Para influir sobre el metabolismo de los ácidos grasos se utilizan las siguientes enzimas, que tienen la propiedad de modificar los productos intermedios del metabolismo de los ácidos grasos y poner a disposición, de esta forma, diferentes productos, por ejemplo, ácidos grasos con cadenas laterales diferentes, para la formación de las partículas polímeras: (R)-enoil-CoA hidratatasas específicas, transacilasas y cetoacil-CoA/ACP reductasas. Estas enzimas exhiben una especificidad diferente en relación con la longitud de cadena del sustrato (R)-hidroxiacil-CoA preparado para la polímero-sintasa. De esta forma, se crean bases estructurales en el polímero con diferentes longitudes de cadena y, por lo tanto, polímeros de diversas composiciones.

Sin embargo, la influencia sobre las vías metabólicas no se puede llevar a cabo solo por la incorporación de enzimas adicionales en la célula, sino también por la adición de inhibidores de la vía metabólica al medio. Ejemplos de tales inhibidores son el ácido acrílico y triclosán (sinónimos: TCC o 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol), por mencionar solo algunos.

#### Ejemplo 3. Preparación *in vivo* de partículas polímeras biodegradables a partir de ácido (R)-3-hidroxiбутírico, con núcleo altamente cristalino

Para este ejemplo se utiliza una cepa de *E. coli* que contiene el plásmido ya mencionado en el Ejemplo 1, pBBad-P, y el plásmido pBHR68. El cultivo se efectuó bajo las condiciones indicadas en el Ejemplo i, usando glucosa como fuente de carbono. Las partículas polímeras formadas están compuestas por ácido (R)-3-hidroxiбутírico y tienen un diámetro de 50 hasta 500 nm, en función de la cantidad de inductor (arabinosa) suministrado al medio. El tamaño medio de las partículas polímeras formadas de esta manera fluctúa solo en alrededor de 20 hasta 50 nm. Como aclaramiento de las propiedades de control, que se generan a través de la fasina inducida por el plásmido pBBad-P, se repite el experimento con la cepa de *E. coli* anteriormente mencionada, pero sin el plásmido pBBad-P. En este caso, se obtienen partículas polímeras con un diámetro de 150-250 nm. El control del tamaño de partícula a través de fasina permite preparar, en comparación con el ensayo de control, partículas polímeras mucho mayores pero, sobre todo, mucho menores.

Se puede llevar a cabo un fraccionamiento adicional de las partículas polímeras en función de su tamaño mediante un procedimiento conocido del estado de la técnica, por ejemplo, cromatografía de exclusión, centrifugación sobre gradiente de densidad o ultrafiltración en solución tampón de fosfato 5 mM (a pH 7,5).

#### Ejemplo 4. Preparación *in vivo* de partículas polímeras biodegradables a partir de (R)-3-hidroxiácidos grasos, con núcleos de baja cristalinidad

En este experimento, se preparan partículas polímeras elastómeras y biodegradables en *E. coli*, cuyos núcleos están formados por (R)-3-hidroxiácidos grasos. Las cadenas polímeras están construidas en promedio por 6 hasta 14 átomos de carbono. Esto se logra por la expresión reguladora del gen phaF de *P. oleovorans* en *E. coli*, que es muy similar al gen codificador de fasina phaP de *R. eutropha*, y el gen para la polímero-sintasa de *P. aeruginosa* (phaC). En este experimento, el producto de expresión del gen phaF se utiliza para controlar el tamaño de partícula. Las partículas polímeras se pueden preparar en células de *E. coli* con un metabolismo alterado de los ácidos grasos solo a través de la polímero-sintasa (phaC) de las *Pseudomonas* (Langenbach, S. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1997, Vol. 150, pág. 303-309). El metabolismo de los ácidos grasos se modifica de tal forma que con el uso de ácidos grasos como fuente de carbono se acumulan intermedios activados por CoA (por ejemplo, enoil-CoA) de la β-oxidación de los ácidos grasos que, una vez más, sirven como precursores de la síntesis de polímeros. Para esto se utilizan mutantes fadB de *E. coli* (Langenbach, S. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1997, Vol. 150, pág. 303-309), o se usan inhibidores que inhiben de manera correspondiente el metabolismo de los ácidos grasos (por ejemplo, ácido acrílico; Qi, Q. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1998, Vol. 167, pág. 89-94). La cetoacil-reductasa y la tiolasa, necesarias en otros casos, ya no son precisas cuando se utilizan mutantes o microorganismos inhibidos. Las enoil-CoA-hidratatasas propias de *E. coli* catalizan entonces la formación de R-3-hidroxiacil-CoA a partir de enoil-CoA. Esta se transforma, a continuación, por acción de la

polímero-sintasa en poli(R)-3-hidroxiácido graso, que constituye el núcleo polímero de la partícula polímera en formación.

#### Clonación

5 El gen phaF de *P. oleovorans*, que ya fue descrito por Prieto et al. (Prieto, M.A. et al., *J. Bacteriol.* 1999, Vol. 181(3), pág. 858-868) y que está registrado en el banco de datos "GenBank" con el número AJ010393, se transforma a través del vector pBBad-F (Fig. 11) en *E. coli*. Este vector se obtiene a partir del vector pBBad22K (Fig. 7). Las distintas etapas de clonación se corresponden con las que se han descrito en el Ejemplo 1. El gen phaF se clona en la interfaz NcoI/BamHI del vector pBBad22K. Los cebadores que se utilizan para la mutagénesis por PCR del gen phaF citado anteriormente tienen las secuencias siguientes: 5'-aaagggccatggctggcaag-aagaattccgagaa-3' (SEC ID NO: 4; la interfaz de NcoI aparece en negrita), y 5'-aaagg-gggtaccagatcagggtaccgggtgctgtctg-3' (SEC ID NO: 5; la interfaz de BamHI aparece en negrita). El fragmento de ADN formado de este modo, con la SEC ID NO: 6, se clona entonces en el plásmido pBBad22K que se ha descrito anteriormente. La secuencia para el plásmido que contiene phaF se designa en lo sucesivo pBBad-F (Fig. 11). Además de este plásmido, también se transforma en *E. coli* el plásmido pBHR71 (Fig. 10; Langenbach, S. et al., *FEMS Microbiol Lett.* 1997, Vol. 150, pág. 303-309), que contiene la secuencia de nucleótidos para la polímero-sintasa.

Como fuente de carbono para la subsiguiente expresión, se utiliza el ácido graso ácido decanoico. La expresión del gen de fasina phaF también se control por medio del inductor arabinosa. Al igual que en el Ejemplo 1, se llevó a cabo el ensayo. Las partículas polímeras generadas de este modo tienen, en función de las cantidades del inductor previamente usado, un diámetro de 100-500 nm.

#### 20 Ejemplo 4. Control del tamaño de partículas polímeras biodegradables preparadas *in vitro*

El control del tamaño de las partículas polímeras biodegradables producidas, en el procedimiento *in vitro*, también se determina a través de la disponibilidad de la polímero-sintasa, de fasina y de proteínas similares a fasina, así como por la disponibilidad de sustratos y de intermedios metabólicos.

25 Para la preparación *in vitro* de las partículas polímeras biodegradables, se deben poner a disposición inicialmente las enzimas y sustratos necesarios. Para este ensayo se utiliza la polímero-sintasa recombinante de *R. eutropha* o *P. aeruginosa* (Gerngross, T.U. y Martin, D.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, Vol. 92, pág. 6279-6283; Qi, Q et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, Vol. 54, pág. 37-43), purificada por medio de cromatografía por afinidad (con fusión His-Tag o Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarosa). De manera análoga, se purifican las proteínas responsables del tamaño de las partículas polímeras de *R. eutropha* o *P. aeruginosa*, para el control del tamaño de partícula. Para la expresión de esta proteína en *R. eutropha* se utiliza el vector que se usó ya en el Ejemplo 1 para la expresión del gen de fasina. La mezcla reactiva para la preparación *in vitro* de las partículas polímeras biodegradables contiene, además de la polímero-sintasa y de la proteína fasina responsable del tamaño de las partículas polímeras: R-3-hidroxiacetil-CoA o R-3-hidroxiacetil-CoA como sustrato para la síntesis de las partículas polímeras, solución tamponada con fosfato 50 mM (a pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM y glicerol al 5% (v/v) para la estabilización. Debido al empleo de R-3-hidroxiacetil-CoA o R-3-hidroxiacetil-CoA como productos precursores para la polímero-sintasa, no es necesario recurrir al uso de las tiolasas y de las reductasas (véase también la Fig. 2).

40 Los resultados de la Fig. 5 muestran la influencia de las proporciones cuantitativas de fasina con respecto a la polímero-sintasa sobre el diámetro de las partículas polímeras, en tanto que la Fig. 6 muestra la influencia de la proporción de sustrato con respecto a la polímero-sintasa sobre el diámetro de las partículas polímeras. Estos resultados demuestran también que la regulación del tamaño de las partículas polímeras se puede controlar por medio de la cantidad de la polímero-sintasa presente. De este modo, por medio del procedimiento según la invención se puede alcanzar una regulación efectiva del tamaño de partícula.

#### Ejemplo 5. Influencia de la composición de las partículas polímeras formadas *in vitro*

##### Ejemplo 5.1: Influencia de la composición del polímero

45 Para modificar la composición de las partículas polímeras biodegradables, se pueden agregar a la mezcla de reacción diferentes sustratos y/o utilizar distintas polímero-sintasas con diferentes espectros de sustrato (véase también el Ejemplo 7). De esta manera, en la formación de las partículas polímeras se incluye una serie de diferentes monómeros en la cadena polímera en crecimiento, y se producen partículas polímeras con diversas composiciones polímeras. A través del uso de la polímero-sintasa de *P. aeruginosa*, se incorporan en la cadena polímera en crecimiento estructuras básicas de R-3-hidroxiácido graso con 6 hasta 14 átomos de C. Si, por ejemplo, se ofrece un solo sustrato, se obtienen partículas polímeras homopolímeras mediante el uso de la polímero-sintasa de *P. aeruginosa*.

En el Ejemplo 2 se pueden encontrar ejemplos adicionales de cómo modificar la composición de las partículas polímeras.

Ejemplo 5.2: Influencia sobre la composición de membrana de las partículas polímeras

5 Para una posterior fusión con la membrana de una célula en la que se deba incorporar, por ejemplo, una sustancia activa, existe la posibilidad de controlar la composición de la capa de fosfolípidos en la superficie de las partículas polímeras biodegradables. En la producción *in vitro* de partículas polímeras biodegradables (Ejemplo 4), esta regulación tiene lugar ya en la preparación de la solución apropiada para la formación de partículas polímeras. Por la adición de una mezcla de diferentes moléculas anfífilas se puede adaptar la membrana a los correspondientes requisitos.

10 A la mezcla de reacción *in vitro* se agregan fosfolípidos. Ahora participa en la formación de las partículas polímeras un número definido de moléculas de la polímero-sintasa. Las partículas polímeras según la invención aumentan de tamaño progresivamente con el incremento de la polimerización y las polímero-sintasas presentes en la superficie ya no son capaces de proteger por completo la superficie de la partícula polímera. En consecuencia, quedan expuestos sectores hidrófobos (polímero) sobre los que se depositan de manera espontánea moléculas anfífilas.

15 En el caso de las partículas generadas *in vivo*, es necesario separar, en primer lugar, la capa de fosfolípidos que ya está presente. Con este fin se lleva a cabo una extracción con acetona o se utilizan fosfolipasas o detergentes no desnaturizantes para degradar la capa de fosfolípidos. A continuación, tal como se ha descrito anteriormente, se suministra una mezcla de las correspondientes moléculas anfífilas a las partículas polímeras ahora prácticamente exentas de lípidos. Preferentemente, se utilizan en este caso fosfolípidos de carga negativa o fosfatidilcolina. En un ejemplo de realización para la regulación dirigida de la composición de membrana, se suspenden las partículas polímeras en PBS que contienen octilglicósido al 1% (a pH 7,5), y se dializa con agitación contra un exceso de fosfatidilcolina. La superficie de partícula producida de este modo es especialmente apropiada para la fusión con las células endoteliales de los capilares del cerebro (BCEC).

Ejemplo 5.3: Incorporación de diferentes sustancias en las partículas polímeras en crecimiento

25 Con ayuda del colorante fluorescente lipófilo Rojo Nilo (Sigma, St. Louis, Mo, EE.UU.) o Rhodamin 123 se ha investigado ya cualitativamente la absorción de sustancias en el núcleo de las partículas polímeras biodegradables (Spiekermann, P. et al., *Arch. Microbiol.* 1999, Vol. 171, pág. 73-80). Cuando se agrega el colorante fluorescente Rojo Nilo al medio o a la mezcla de reacción, en los procedimientos *in vivo* o *in vitro*, respectivamente, se puede observar una coloración de las partículas polímeras producidas, es decir, la coloración de las partículas polímeras aparece ya durante su síntesis e, incluso, antes de aislarlas de la célula.

30 A través de la adición de sustancias farmacéuticamente activas, es posible incorporarlas en el núcleo polímero de las partículas. Por ejemplo, en un experimento *in vitro* para preparar partículas polímeras, se agrega el antitumoral apolar Paclitaxel a la mezcla de reacción. El Paclitaxel insoluble en agua se disuelve y se concentra en el núcleo polímero hidrófobo de las partículas polímeras. Paclitaxel se agrega únicamente a la solución para la formación de partículas polímeras, tras lo cual la sustancia activa se concentra en las partículas. Esto se comprueba retirando las partículas polímeras tras su formación de la mezcla de reacción, y analizando en la solución por HPLC la presencia de Paclitaxel. El descenso de la concentración de Paclitaxel en la solución demuestra que se ha incorporado a las partículas polímeras. Con la posterior biodegradación de las partículas polímeras en el organismo, se produce la liberación de la sustancia activa. Como ensayo de control se utiliza una mezcla de reacción exenta de partículas polímeras, en la que la concentración de Paclitaxel no se reduce en la solución adecuada para la formación de partículas polímeras.

Ejemplo 6. Funcionalización de la superficie de las partículas

40 Las sustancias biológicamente activas pueden unirse a proteínas que se encuentran ya en la superficie de las partículas polímeras. Para ello, se toman en consideración todas las proteínas citadas en la Fig. 1. De este modo, se plantea una serie de estrategias de entrecruzamiento, que permiten un enlace covalente de la sustancia biológicamente activa con proteínas que están unidas a la superficie de la partícula.

Ejemplo 6.1: Modificación dirigida de una proteína de superficie para la fijación de una sustancia activa farmacéutica

45 Un ejemplo de la funcionalización de las partículas polímeras es la fijación de doxorrubicina ligada a hidrazona (King, H.D. et al., *Biconjugate Chem.* 1999, Vol. 10, pág. 279-288 describieron la doxorrubicina ligada a hidrazona) a la polímero-sintasa PhaC1 de *P. aeruginosa*, que está unida a la superficie de la partícula polímera y contiene los dos restos cisteína incorporados en el extremo N-terminal. Estos restos cisteína forman el dominio de fijación de la polímero-sintasa, a través del cual se pueden unir las sustancias biológicamente activas.

Clonación

50 Los tripletes codificadores de los restos cisteína se clonan por mutagénesis por PCR en el gen que codifica PhaC1 que, a continuación, se clona en la interfaz de XbaI y BamHI del plásmido pBHR71 representado en la Figura 10. En esta mutagénesis por PCR se incorporan en el gen también las interfaces para XbaI y BamHI. Los cebadores utilizados para la mutagénesis por PCR del gen que codifica PhaC1 tienen las secuencias siguientes: Cebador para el extremo N-terminal

5'-gggct**ctagaa**ataaggagatacatatg**tttga**agaacaataacgagctt-3' (SEC ID NO: 7, la interfaz de XbaI aparece en negrita; triplete Cys subrayado), y cebador para el extremo C-terminal

5'-aaacg**ggatc**ctttcatgttcatgca-3' (SEC ID NO: 8, la interfaz de BamHI aparece en negrita). El fragmento de ADN formado de este modo, con la SEC ID NO: 9, se hidroliza entonces con XbaI y BamHI y se liga en el plásmido pBHR71 que ha sido hidrolizado de manera análoga. El plásmido resultante, denominado pBHR71-Cys (Fig. 12) se transforma en *E. coli* por medio de técnicas conocidas, donde hace posible la formación de partículas polímeras que portan sobre su superficie una polímero-sintasa que presenta dos restos cisteína para la unión de diversas sustancias, en particular, sustancias farmacéuticas.

#### Ejemplo 6.1.1. Unión de doxorubicina (Sinónimo: hidroxil daunorrubicina)

10 A través de estos restos cisteína expuestos en la superficie puede tener lugar un entrecruzamiento mediado por hidrazona. Para ello, se procede de la forma siguiente: se incuban 100 mg de la partícula polímera aislada (volumen total 1 ml), sobre la que está unida la polímero-sintasa, con PBS tratado con gas helio (a pH 7,5) y ditioneitol (DTT) 5 mM, durante 3 h a 37°C. Por medio de este tratamiento, se reducen los puentes disulfuro en la polímero-sintasa. A continuación, se separan por centrifugación durante 30 min a 4°C y 40.000 x g los enlaces moleculares inferiores.

15 Entonces, se suspende la partícula polímera reducida, con 1 ml de tampón PBS (a pH 7,5), que contienen 10 µmol de doxorubicina unida a hidrazona, y se incuba durante 30 min a 4°C. Seguidamente, se lleva a cabo una nueva centrifugación bajo las condiciones mencionadas más arriba, para lavar la partícula polímera tratada. Por medio de la subsiguiente HPLC se detecta doxorubicina no fijada y, a través de la concentración reducida, se comprueba su eficaz incorporación a la polímero-sintasa.

20 Ejemplo 6.2: Unión de sustancias biológicamente activas, en especial sustancias farmacéuticamente activas, a los dominios de fijación de la partícula polímera

Las sustancias activas también pueden unirse a las partículas polímeras fijándose a través de los dominios de fijación a las proteínas que están unidas a la superficie de la partícula polímera. Para ello, se debe obtener en primer lugar un dominio de fijación. La unión de sustancias biológicamente activas se consigue por la modificación genética de las proteínas de la partícula polímera unidas a la superficie (tales como, por ejemplo, polímero-depolimerasa, fasina o proteínas similares a fasina, polímero-sintasa, regulador del polímero), de manera que estas proteínas formen un dominio de fijación orientado hacia el exterior, a través del cual se puede unir un reactivo de acoplamiento o una sustancia biológicamente activa. En la fusión de las proteínas de superficie anteriormente mencionadas de la partícula polímera con una proteína que hace posible directamente la unión de un reactivo de acoplamiento o de una sustancia biológicamente activa, se debe prestar atención en este procedimiento al hecho de que, después de la fusión con la proteína de superficie de la partícula polímera se deben conservar por completo la funcionalidad tanto de la proteína de superficie como de la proteína fusionada.

En un ejemplo de realización, se fusiona una partícula polímera con dos epítomos FLAG directamente en el extremo N-terminal de la polímero-sintasa PhaC1 de *P. aeruginosa*. Los epítomos FLAG permiten la unión de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-FLAG comerciales (Anti-FLAG M2, Sigma-Aldrich) y, subsiguientemente, de marcadores enzimáticos, que deben confirmar la realización correcta del procedimiento. En este ejemplo, se utilizan como marcadores enzimáticos conjugados secundarios de anticuerpo-fosfatasa alcalina (Anti-Ratón-Fosfatasa Alcalina, Sigma-Aldrich). Subsiguientemente, se determina por fotometría la actividad de la fosfatasa alcalina en la superficie de la partícula polímera.

40 Ejemplo 6.2.1: Preparación de una partícula polímera con una proteína de fusión FLAG-PhaC1

Para la preparación de la proteína de fusión de FLAG-polímero-sintasa se utilizan los siguientes oligonucleótidos: 5'-tatg**actagt**gattataagatgatgataaaca-3' y 5'-tatg**tttcatcatcatcttataatcactagt**ca-3' (SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 11, respectivamente, interfaz de SpeI en negrita, epítipo FLAG subrayado). Para la obtención de ADN de doble cadena por hibridación, se mezclan ambos oligonucleótidos en cantidades equimolares (sendos 10 µM) entre sí y se incuba a temperatura ambiente (RT) durante 30 min. El ADN de doble cadena obtenido de esta forma codifica el epítipo FLAG (DYKDDDDK) y posee extremos superpuestos (TA), que son complementarios con los extremos superpuestos de la interfaz (CAVTATG / GTAT<sub>2</sub> AC). Este fragmento de ADN se hidroliza con la enzima de restricción NdeI y se clona en el vector pBHR71 que está hidrolizado también de manera análoga (Fig. 10). El plásmido formado de este modo, pBHR71-FLAG (Fig. 13), contiene el gen con la SEC ID NO: 12 y media la expresión de una polímero-sintasa con una fusión-FLAG N-terminal (esta parte de la proteína forma el dominio de fijación). A través de este dominio de fijación se pueden unir entonces sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento. La interfaz SpeI singular, que también se ha incorporado durante la clonación, se encuentra disponible adicionalmente para la inserción de cualquier fragmento adicional de ADN que codifique la proteína de fusión.

55 Como ejemplo de la funcionalidad de la construcción mencionada anteriormente, se procede del modo siguiente: Las partículas polímeras se expresan después de la transformación del plásmido pBHR71-FLAG en cepas de *E. coli* que ya contienen el plásmido pBBad-F, y que exhiben un metabolismo modificado de los ácidos grasos (véase el Ejemplo 3). Por la desintegración de las células, se aíslan las partículas polímeras de las células y se lavan tres veces con tampón PBS (a pH 7,5). A continuación, se incuban las partículas polímeras durante 30 min a RT con anticuerpos monoclonales

anti-FLAG, que se unen a los epítomos FLAG. Seguidamente, se lavan nuevamente las partículas polímeras de la forma descrita anteriormente y, a continuación, se incuban con un conjugado secundario de fosfatasa alcalina durante 30 min a RT en tampón PBS. Después de los 30 min de incubación, se lavan estas partículas en Tris-HCl 0,1M (a pH 8,5) y, entonces, se agregan a la suspensión de partículas 2 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo como sustrato para la fosfatasa alcalina. La actividad de la fosfatasa alcalina se mide por espectrometría a 410 nm. Como controles negativos se utilizan partículas polímeras que contienen un polímero-sintasa sin dominios de fijación, es decir, exentas del epítomo FLAG. Debido a la ausencia de reacción del fosfato de p-nitrofenilo suministrado, las mediciones espectrométricas a 410 nm en los controles dan un resultado negativo. El hecho de que se hayan podido formar las partículas polímeras es una confirmación de que la incorporación del epítomo FLAG no ejerce ningún efecto sobre la funcionalidad de la polímero-sintasa.

Este procedimiento se puede llevar a cabo también con otras proteínas de superficie de las partículas polímeras que ya se han mencionado. Si se modifican simultáneamente múltiples proteínas de superficie, es posible unir múltiples sustancias diferentes a la partícula polímera y hacer posible, de este modo, una multifuncionalidad que permite su utilización en diversas aplicaciones.

Aunque en el ejemplo anterior se ha unido una sustancia biológicamente activa de forma ulterior a una proteína de superficie de la partícula polímera ya expresada y formada, existe evidentemente también la posibilidad de fusionar la proteína directamente con la proteína de superficie y que su expresión se efectúe solo entonces. Para ello, se fusionan las secuencias de codificación de las proteínas (por ejemplo, enzimas) con los extremos C-terminales del gen de phaC1 del plásmido pBHR71-FLAG.

Por PCR se obtienen fragmentos de ADN que codifican respectivamente la proteína que se debe incorporar y la sección C-terminal de la polímero-sintasa, para permitir la fusión con el gen phaC1. Los dos fragmentos se ligan entre sí sobre una interfaz de restricción equipada con cebadores superpuestos. En el extremo 5' de este gen híbrido se introducen, a través de un cebador superpuesto, un punto de fijación ribosómico (GAGGAG) y una interfaz de restricción a una distancia de 7 nt con respecto al codón de inicio. Cuando el vector usado como, por ejemplo, el vector pBHR71-FLAG empleado en este caso, contiene ya un punto de fijación ribosómico, ya no es necesario introducir adicionalmente otro punto de fijación ribosómico. Junto con una interfaz de restricción insertada en el extremo 3' de este gen híbrido, resulta posible la clonación dirigida en el vector de expresión pBHR71-FLAG. Las interfaces de restricción de los extremos 5' y 3' del gen híbrido se deben seleccionar de manera que no aparezcan repetidas una segunda vez dentro del gen híbrido, para que la clonación en un vector de expresión se pueda llevar a cabo de forma co-lineal con el promotor presente. En este ejemplo, se amplifica el gen lacZ de *E. coli* por PCR con cebadores que contienen una interfaz SpeI: 5'-ggactagtgatgagcatgattacggattcactggc-3' (SEC ID NO: 13, interfaz de SpeI en negrita), y 5'-ccactagttttgacaccagaccaactgtaagtgtagcg-3' (SEC ID NO: 14, interfaz de SpeI en negrita). Adicionalmente, usando estos cebadores se separa el codón de detención de la secuencia del gen lacZ con el fin de obtener un marco de lectura ininterrumpido. El fragmento de ADN resultante de aquí, SEC ID NO: 15, se clona directamente en la interfaz SpeI del plásmido pBHR71-FLAG. La proteína de fusión obtenida dio lugar a la formación de partículas polímeras con actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Se aíslan las correspondientes partículas polímeras y bajo condiciones de reducción, se detecta la actividad de  $\beta$ -galactosidasa con el sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (Calbiochem).

#### Ejemplo 7. Estabilidad de la unión entre las proteínas de superficie y el núcleo polímero de las partículas polímeras

En el marco de la invención, los estudios realizados han demostrado que la polímero-sintasa no se puede desprender del núcleo de las partículas polímeras biodegradables mediante tratamiento con reactivos desnaturalizantes tales como, por ejemplo, dodecilsulfato sódico (SDS), urea, hidrócloruro de guanidina o ditiotreitól, ni por el uso de condiciones ácidas. Esto señala hacia un enlace covalente formado entre la partícula polímera y el dominio de fijación de la partícula polímera de la polímero-sintasa. La elevada estabilidad de la unión permite un transporte estable de las sustancias unidas o incorporadas en la partícula polímera hasta su punto de acción. La sección N-terminal de la polímero-sintasa unida a la superficie (extremo N-terminal hasta el inicio de los dominios de  $\alpha/\beta$ -hidrolasa conservados) es extraordinariamente variable y puede ser sustituida, por procedimientos genéticos, con proteínas funcionales. En este caso, la actividad de la polímero-sintasa y la síntesis de partículas polímeras (Rehm, B.H.A. et al., *Biochem. Biophys. Acta* 2002, Vol. 1594, pág. 178-190) están conservadas. En consecuencia, se alcanza una funcionalización de la superficie que exhibe una alta estabilidad. En caso de necesidad, es posible aplicar simultáneamente una mezcla de diferentes proteínas con diversos dominios de fijación, a los que se unen sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento, de modo que se alcanza una multifuncionalización de la superficie de la partícula polímera. La administración de estas proteínas se lleva a cabo, *in vitro*, por el aporte de las proteínas purificadas con diferentes dominios de fijación a la mezcla de síntesis o, *in vivo*, por la expresión de los genes en el correspondiente microorganismo, que codifica una proteína determinada con un dominio de fijación.

#### Ejemplo 7.1: Posibilidades adicionales de modificación de las proteínas de superficie de la partícula polímera

La sección C-terminal de la proteína de superficie fasina (PhaP) de *R. eutropha* (restos de aminoácidos a partir de > Ala 141) es hidrófila y puede ser sustituida con proteínas funcionales, sin impedir el anclaje de la fasina a través del dominio de fijación de la partícula polímera a la superficie de la partícula polímera. Este anclaje se basa en interacciones hidrófobas y es reversible (Hanley, S.Z. et al., *FEBS Letters* 1999, Vol. 447, pág. 99-105). Esta sección C-terminal de las

polímero-depolimerasas intracelulares se fusiona por procedimiento de ingeniería genética con proteínas funcionales y permite, de esta forma, la funcionalización de la superficie de la partícula polímera por medio de la subsiguiente unión de sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento.

5 El extremo C-terminal (restos de aminoácidos a partir de >180) de la polímero-depolimerasa intracelular de *R. eutropha* facilita la unión de la enzima al núcleo de la partícula polímera (Saegusa, H. et al., *J. Bacteriol.* 2001, Vol. 183(1), pág. 94-100). Esta sección C-terminal de las polímero-depolimerasas intracelulares se fusiona por medio de procedimiento de ingeniería genética con proteínas funcionales, y permiten de este modo una funcionalización de la superficie de la partícula polímera.

10 El extremo N-terminal (resto de aminoácidos a partir de >140) de los productos de expresión de los genes *phal* y *phaF* de *Pseudomonas oleovorans*, unidos a la superficie de la partícula polímera, facilita la unión de las proteínas al núcleo de poliéster de la partícula polímera (Prieto, M.A. et al., *J. Bacteriol.* 1999, Vol. 181(3), pág. 858-868). Esta sección N-terminal de los productos de expresión de los genes *phaF* y *phal* se fusiona, por medio de procedimientos de ingeniería genética, con las proteínas funcionales, y los dominios de fijación formados de este modo permiten, subsiguientemente, la funcionalización de la superficie de la partícula polímera a través de la unión de sustancias biológicamente activas y/o reactivos de acoplamiento.

15 Ejemplo 8. Modificación covalente de las proteínas de superficie de la partícula polímera con un reactivo de acoplamiento

20 Las proteínas representadas en la Figura 1, en la superficie de las partículas polímeras biodegradables, se pueden tratar con sustancias marcadoras especiales que se unen específicamente a determinados aminoácidos (por ejemplo, N-hidroxisuccinimida-biotina a lisina). Este hecho permite la unión de sustancias biológicamente activas, tales como por ejemplo de biotina a través de un enlace mediado por acetamida de yodo a cisteína. Las moléculas como la biotina facilitan, seguidamente, un acoplamiento adicional de sustancias biológicamente activas a las proteínas de superficie de esta partícula polímera. A este grupo de sustancias pertenecen, por ejemplo, avidina o estreptavidina, que pueden estar unidas por sí mismas a enzimas, permitiendo de esta forma una funcionalización gradual de las proteínas de superficie de las partículas polímeras biodegradables (Rehm, B.H.A. et al., *J. Bacteriol.* 1994, Vol. 176, pág. 5639-5647). Esta funcionalización se puede llevar a cabo por la unión de anticuerpos o sustancias farmacéuticamente activas. Así mismo, se pueden incorporar moléculas con diferentes cargas de superficie, para conferir a la partícula polímera una carga determinada sobre la superficie, que resulta conveniente para el transporte y la fusión a través/con determinadas membranas.

30 Por medio de la N-hidroxisuccinimida-biotina se produce el marcaje de restos lisina en las proteínas de superficie de las partículas polímeras con biotina. En este experimento, se utilizan partículas polímeras portadoras de la polímero-sintasa PhaC1 de *P. aeruginosa*, aislada de *E. coli* recombinante, que a su vez porta el plásmido pBHR71. Después de aislarlas, las partículas polímeras se lavan tres veces en PBS (a pH 8,0) y se agrega, entonces, N-hidroxisuccinimida-biotina (Sigma-Aldrich) a la solución, hasta una concentración final de 5 mM. La reacción se finaliza por un nuevo lavado después de 5 min de incubación a 4°C. La demostración de la biotina unida a la superficie de las partículas se efectúa con ayuda del conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) y fosfato de o-nitrofenilo (Calbiochem) como sustrato. En la mezcla de control con partículas que no habían sido tratadas con N-hidroxisuccinimida-biotina, estas no exhiben ninguna actividad de fosfatasa alcalina.

40 Además de los ejemplos ofrecidos en esta memoria, existen para la fijación de sustancias biológicamente activas todavía numerosos reactivos de acoplamiento, con cuya ayuda se pueden activar las proteínas de superficie de las partículas polímeras preparadas en este documento.

<118> Rehm, PD Dr. Bern H.A.

<120> Procedimiento para la preparación de partículas polímeras funcionalizadas y degradables y su uso como vehículos para medicamentos.

<130> P200428

<150> DE 102 40 034.0  
 <151> 2002-08-30

<160> 15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 1  
 aaaggcccca tggctctcac cccggaaca 29

<210> 2  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 2  
 aaaggccgga tcctcagggc actaccttca tcg 33

<210> 3  
 <211> 708  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> La secuencia contiene el ADN de R. eutropha que codifica phaP

<400> 3  
 aaaggcccca tgatcctcac cccggaacaa gttgcagcag cgcaaaaggc caacctcgaa 60  
 acgctgttcg gcctgaccac caaggcgttt gaaggcgtcg aaaagctcgt cgagctgaac 120  
 ctgcaggctc tcaagacttc gttcgcagaa ggcgttgaca acgccaagaa ggcgctgtcg 180  
 gccaaaggacg cacaggaact gctggccatc caggccgcag ccgtgcagcc ggttgccgaa 240  
 aagaccctgg cctacaccog ccaacctgtat gaaatcgctt cggaaaccca gagcgagttc 300  
 accaaggtag ccgaggetca actggccgaa ggetcgaaga acgtgcaagc gctggctcgag 360  
 aacctcgcca agaacgcccc ggccggttcg gaatcgaccg tggccatcgt gaagtcgagc 420

# ES 2 360 617 T3

```

atctccgctg ccaacaacgc ctacgagtcg gtgcagaagg cgaccaagca agcggtcgaa 480
atcgtgaaa ccaacttcca ggctgcggtc acggctgcca ccaaggctgc ccagcaagcc 540
agcggccagg cccgtacggc cacggcaaag aagacgacgg ctgcctgata actgcctgcg 600
ttgaagatgg accggctgcg gccggtcogt tggcaaagca tatcgacgcc tggcgtttgc 660
gggtgtttt gccaacgatg aaggtagtgc cctgaggatc cggccttt 708

```

```

<210> 4
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 4
aaagggccat ggctggcaag aagaattccg agaa 34

```

```

<210> 5
<211> 39
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 5
aaagggggat cctcagatca gggtagcgt gcctgtctg 39

```

```

<210> 6
<211> 793
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> La secuencia contiene ADN de P. oleovorans que codifica phaF

```

```

<400> 6
aaagggccat ggctggcaag aagaattccg agaaagaagg cagctcctgg gtcggcggga 60
tcgagaagta ctcccgcaag atctggctgg cggggcttgg tatctattcg aagatcgacc 120
aggacggccc gaagctgttc gactcgtgaa taaaggatgg cgagaaggcc gagaaacagg 180
cgaagaagac cgcagaagat gttgctgaaa ctgccaagtc gtcgaccact tcgctgtgtg 240
cgggcgtgaa ggaccgtgcg ctaggcaagt ggagcgaact cgaagaggcc ttcgacaagc 300
gcctgaacag tgccatctcg cgcttgcg tgccgagccg caacgagatc aaggccctgc 360
accagcaggt ggacagcctg accaagcaga tcgagaaact caccggcgtc tcggttacc 420
cgatttcgtc gcgcaactga gccaaaccgg ctgcgagcaa ggcggcggcc aagccactgg 480
ccaagacggc agcggccaag cctgcggcaa aaaccgccc agccaagccg gcagccaagg 540
ccgcagcggc taaacctgct gccaaactg cggcggccaa gcctgcggcg aaaccggcag 600

```

# ES 2 360 617 T3

```

cggccaaacc ggctgtggcg aagaagcctg cagtgaagaa agcaccggcc aagccggcag      660
ccgccaagcc ggcagctcca gcggccagcg ccgctccggc cgctagcgea gttcggcgcc      720
cactgctggct ccggccagca acccgcttc ggcacagaca ggcaccggta ccctgatctg      780
aggatcccc ttt                                                                793

```

```

<210> 7
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 7
gggctctaga aataaggaga tatacatatg tgttgtaaga acaataacga gctt          54

```

```

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 8
aaacgctgat ccttttcac gttcatgca                                          29

```

```

<210> 9
<211> 1722
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> La secuencia contiene el ADN de P. aeruginosa que codifica PhaC1

```

```

<400> 9
gggctctaga aataaggaga tatacatatg tgttgtaaga acaataacga gcttccccaaag      60
caagccggcg aaaacacgct gaacctgaat ccggtgatcg gcatccgggg caaggacctg      120
ctcacctccg cgcgcatggt cctgctccag gcggtgcgcc agccgctgca cagcgccagg      180
cacgtggcgc atttcagcct ggagctgaag aacgtcctgc tcggccagtc ggagctacgc      240
ccaggcgatg acgaccgacg cttttccgat ccggcctgga gccagaatcc actgtacaag      300
cgctacatgc agacctacct ggctggcgc aaggagctgc acagctggat cagccacagc      360
gacctgtcgc cgcaggacat cagtctggc cagttcgtca tcaacctgct gaccgaggcg      420
atgtcgccga ccaacagcct gagcaaccog gcggcggta agcgetttctt cgagaccggc      480
ggcaagagcc tgctggacgg cctcggccac ctggccaagg acctggtgaa caacggcggg      540
atgccgagcc aggtggacat ggacgccttc gaggtgggca agaacctggc caccaccgag      600
ggcgccgtgg tgttccgcaa cgacgtgctg gaactgatcc agtaccggcc gatcaccgag      660

```

# ES 2 360 617 T3

```

tcggtgcacg aacgcccgt gctggtggtg ccgccgcaga tcaacaagtt ctacgtottc 720
gacctgtcgc cggacaagag cctggcgcgc ttctgcctgc gcaacggcgt gcagaccttc 780
atcgtcagtt ggcgcaaccc gaccaagtcg cagcgcgaat ggggcctgac cacctatatac 840
gaggcgtca aggaggccat cgaggtagtc ctgtcgatca ccggcagcaa ggacctcaac 900
ctcctcggcg cctgctccgg cgggatcacc accgcgaccc tggtcggcca ctacgtggcc 960
agcggcgaga agaaggtcaa cgcttcacc caactggtca gcgtgctoga cttcgaactg 1020
aatacccagg tcgcgctggt cgcgacgag aagactctgg aggccgcaa gcgtcgttcc 1080
taccagtccg gcgtgctgga gggcaaggac atggccaagg tgttcgcctg gatgcgcccc 1140
aacgacctga tctggaacta ctgggtcaac aactacctgc tcggcaacca gccgcggcg 1200
ttcgacatcc tctactggaa caacgacacc acgcgcctgc ccgccgcgt gcacggcgag 1260
ttcgtogaac tgttcaagag caaccgcgtg aaccgccccg gcgcctgga ggtctccggc 1320
acgcccacgc acctgaagca ggtgacttgc gacttctact gtgtcgcgg tctgaacgac 1380
cacatcccc cctgggagtc gtgtacaag tcggccaggc tgctgggtgg caagtgcgag 1440
ttcatcctct ccaacagcgg tcacatccag agcatcctca acccaccggg caaccccaag 1500
gcacgcttca tgaccaatcc ggaactgccc gccgagccca aggcctggct ggaacaggcc 1560
ggcaagcacg ccgactcgtg gtggttgac tggcagcaat ggctggccga acgctccggc 1620
aagaccgcga aggcgcccgc cagcctgggc aacaagacct atccggccgg cgaagccgg 1680
cccggaacct acgtgcatga acgatgaaaa ggatccgcgt tt 1722

```

```

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 10
tatgactagt gattataaag atgatgatga taaaca 36

```

```

<210> 11
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador

```

```

<400> 11
tatgtttatc atcatcatct ttataatcac tagtca 36

```

```

<210> 12
<211> 1716

```

<213> Artificial

<220>

<223> La secuencia contiene el ADN de P. aeruginosa que codifica PhaC1 y el ADN que codifica un epitopo FLAG

<400> 12

```

atgactagtg attataaaga tgatgatgat aaacatatga gtcagaagaa caataacgag      60
cttccaagc aagccgcgga aaacacgctg aacctgaatc cggatgatcg catccggggc      120
aaggacctgc tcacctccgc gcgcatggtc ctgctccagg cggatgcgca gccgctgcac      180
agcgcaggc acgtggcgca ttccagcctg gagctgaaga acgtcctgct cggccagtcg      240
gagctacgcc caggcgatga cgaccgacgc tttccgac cggcctggag ccagaatcca      300
ctgtacaagc gctacatgca gacctacctg gcctggcgca aggagctgca cagctggatc      360
agccacagcg acctgtcgcc gcaggacatc agtcgtggcc agttcgatc caacctgctg      420
accgagggca tgtcgccgac caacagcctg agcaaccggg cggcggtaa gcgcttcttc      480
gagaccggcg gcaagagcct gctggacggc ctggccacc tggccaagga cctggtgaac      540
aacggcgggg tgccgagcca ggtggacatg gacgccttcg aggtgggcaa gaacctggcc      600
accaccgagg gcgccgtggt gttccgcaac gacgtgctgg aactgatcca gtaccggccg      660
atcaccgagt cggtgcaagc acgcccgctg ctgggtggtc cgccgagat caacaagtcc      720
tacgtcttcg acctgtcgcc ggacaagagc ctggcgcgct tctgcctgag caacggcgtg      780
cagaccttca tcgtcagttg gcgcaaccgg accaagtcgc agcgcgaatg gggcctgacc      840
acctatatcg aggcgctcaa ggaggccatc gaggtagtcc tgtcgatcac cggcagcaag      900
gacctcaacc tcctcggcgc ctgctccggc gggatcacca ccgcgacct ggtcgccac      960
tacgtggcca gcgcgagaa gaaggtcaac gccttcaccc aactggtcag cgtgctcgac     1020
ttcgaactga ataccaggt cgcgctgttc gccgacgaga agactctgga ggccgccaag     1080
cgtcgttcct accagtccg cgtgctggag ggcaaggaca tggccaaggt gttcgctgg      1140
atgcgcccc aacacctgat ctggaactac tgggtcaaca actacctgct cggcaaccag     1200
ccgcccggct tcgacatcct ctactggaac aacgacacca cgcgctgcc cgcgcgctg      1260
cacggcgagt tcgtogaact gttcaagagc aaccgctga accgccccg cgcctggag      1320
gtctcggca cggccatcga cctgaagcag gtgacttgcg acttctactg tgtcgccggt     1380
ctgaacgacc acatcaccgc ctgggagtcg tgctacaagt cggccaggct gctgggtggc     1440
aagtgcgagt tcacacctc caacagcggc cacatccaga gcatcctca cccaccgggc     1500
aaccccaagg cacgcttcat gaccaatccg gaactgccc cggagccaa ggctggctg      1560
gaacaggccg gcaagcacgc cgaactgtgg tggttgcaact ggagcaatg gctggccgaa     1620
cgctccggca agaccgcaa ggcgcccgc agcctgggca acaagaccta tccggccggc     1680

```

gaagccgcgc ccggaacctc cgtgcatgaa cgatga 1716

<210> 13  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 13  
 ggactagtat gaccatgatt acggattcac tggc 34

<210> 14  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 14  
 ccactagttt ttgacacca gaccaactgg taatggtagc g 41

<210> 15  
 <211> 3088  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> La secuencia contiene el gen lacZ de E. coli

<400> 15  
 ggactagtat gaccatgatt acggattcac tggccgctgt tttacaacgt cgtgactggg 60  
 aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc 120  
 gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 180  
 aatggcgctt tgccctggtt ccggcaccag aagcggtgcc ggaaagctgg ctggagtgcg 240  
 atcttctcga ggcgatact gtcgtcgtcc cctcaaactg gcagatgcac ggttacgatg 300  
 cgcccatcta caccaacgtg acctatccca ttacgggtcaa tccgccgttt gttcccacgg 360  
 agaatccgac gggttggttac tcgctcacat ttaatgttga tgaaagctgg ctacaggaag 420  
 gccagacgcg aattatTTTT gatggcggtta actcggcggt tcatctgtgg tgcaacgggc 480  
 gctgggtcgg ttacggccag gacagtcgtt tgccgtctga atttgacctg agcgcatTTT 540  
 tacgcgccgg agaaaaccgc ctcgcggtga tgggtgctgcg ctggagtgcg ggcagttatc 600  
 tggaagatca ggatatgtgg cggatgagcg gcattttccg tgacgtctcg ttgctgcata 660  
 aaccgactac acaaatcagc gatttccatg ttgccactcg cttaaatgat gatttcagcc 720  
 gcgctgtact ggaggctgaa gttcagatgt gcggcgagtt gcgtgactac ctacgggtaa 780  
 cagtttcttt atggcaggtt gaaacgcagg tcgccagcgg caccgcgcct ttcggcggtg 840

ES 2 360 617 T3

aaattatcga tgagcgtggt ggttatgccg atcgcgtcac actacgtctg aacgtcgaaa 900  
 acccgaaact gtggagcgcc gaaatcccg atctctatcg tgcggtggtt gaactgcaca 960  
 ccgccgacgg cacgctgatt gaagcagaag cctgcgatgt cggtttccgc gaggtgcgga 1020  
 ttgaaaatgg tctgctgctg ctgaacggca agccgttgct gattcgaggc gttaaccgtc 1080  
 acgagcatca tcctctgcat ggtcaggcca tggatgagca gacgatggtg caggatatcc 1140  
 tgctgatgaa gcagaacaac tttaacgccg tgcgctgttc gcattatccg aaccatccgc 1200  
 tgtggtacac gctgtgcgac cgctacggcc tgtatgtggt ggatgaagcc aatattgaaa 1260  
 cccacggcat ggtgccaatg aatcgtctga ccgatgatcc gcgctggcta ccggcgatga 1320  
 gcgaacgcgt aacgcgaatg gtgcagcgcg atcgtaatca cccgagtgtg atcatctggt 1380  
 cgctggggaa tgaatcaggc cacggcgcta atcacgacgc gctgtatcgc tggatcaaat 1440  
 ctgtcgatcc ttcccgccg gtgcagtatg aaggcggcgg agccgacacc acggccaccg 1500  
 atattatttg cccgatgtac gcgcgcgtgg atgaagacca gcccttcccg gctgtgccga 1560  
 aatggtccat caaaaaatgg ctttcgctac ctggagagac gcgcccgctg atcctttgcg 1620  
 aatacgccca cgcgatgggt aacagtcttg gcggtttcgc taaatactgg caggcgtttc 1680  
 gtcagtatcc ccgtttacag ggcggcttcg tctgggactg ggtggatcag tcgctgatta 1740  
 aatatgatga aaacggcaac ccgtggtcgg cttacggcgg tgattttggc gatacgccga 1800  
 acgatcgcca gttctgtatg aacggctctgg tctttgccga ccgcacgccg catccagcgc 1860  
 tgacggaagc aaaacaccag cagcagtttt tccagttccg tttatccggg caaaccatcg 1920  
 aagtgaccag cgaataactg ttccgtcata gcgataacga gtcctgcac tggatggtgg 1980  
 cgctggatgg taagccgctg gcaagcgggt aagtgcctct ggatgtcgtc ccacaaggta 2040  
 aacagttgat tgaactgcct gaactaccgc agccggagag cgcggggcaa ctctggctca 2100  
 cagtacgcgt agtgcaaccg aacgcgaccg catggtcaga agccgggcaac atcagcgcct 2160  
 ggcagcagtg gcgtctggcg gaaaacctca gtgtgacgct ccccgccgcg tcccacgcca 2220  
 tcccgcactc gaccaccagc gaaatggatt tttgcatcga gctgggtaat aagcgttggc 2280  
 aatttaaccg ccagtcaggc tttctttcac agatgtggat tggcgataaa aaacaactgc 2340  
 tgacgccgct gcgcgatcag ttccccgtg caccgctgga taacgacatt ggcgtaagtg 2400  
 aagcgaccgg cattgaccct aacgcctggg tcgaacgctg gaaggcggcg ggccattacc 2460  
 aggccgaagc agcgttgttg cagtgcacgg cagatacaact tgctgatgcg gtgctgatta 2520  
 cgaccgctca cgcgtggcag catcagggga aaaccttatt tatcagccgg aaaacctacc 2580  
 ggattgatgg tagtggcaaa atggcgatta ccgttgatgt tgaagtggcg agcgatacac 2640  
 cgcacccggc gcggattggc ctgaactgcc agctggcgca ggtagcagag cgggtaaact 2700  
 ggctcggatt agggccgcaa gaaaactatc ccgaccgcct taactgccgc tgttttgacc 2760

# ES 2 360 617 T3

gctgggatct gccattgtca gacatgtata ccccgtagct cttcccgagc gaaaacggtc	2820
tgcgctcggg gacgcgcgaa ttgaattatg gccacacca gtggcgcggc gacttcagc	2880
tcaacatcag ccgctacagt caacagcaac tgatggaaac cagccatcgc catctgctgc	2940
acgcggaaga aggcaatgg ctgaatatcg acggttcca tatggggatt ggtggcgacg	3000
actcctggag cccgtcagta tcggcggaat tccagctgag cgccggtcgc taccattacc	3060
agttggtctg gtgtcaaaaa actagtgg	3088

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de partículas polímeras biodegradables, que comprende:
- a) Disponer una célula, en la que se ha incorporado al menos un gen inducible, en donde el gen codifica una proteína que controla el tamaño de la partícula polímera; y
- 5 en el que se ha incorporado en el organismo, adicionalmente, otro gen que codifica una polímero-sintasa; y
- en donde, la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que comprende una proteína biológicamente activa, o en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que es capaz de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de manera directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, es capaz de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de manera directa o a través de un reactivo de acoplamiento; y
- 10 b) Cultivo de la célula, bajo la inducción del al menos un gen inducible, mencionado en el anterior punto a), en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para la preparación de las partículas polímeras biodegradables por parte de la célula.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína que controla el tamaño es una proteína de fusión que comprende una proteína biológicamente activa, o en el que la proteína que controla el tamaño es capaz, además, de unirse a una sustancia biológicamente activa ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la al menos una polímero-sintasa comprende un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, o el procedimiento según la reivindicación 2, en el que la al menos una polímero-sintasa y la proteína que controla el tamaño comprenden, respectivamente, un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, en donde el al menos un dominio de fijación es capaz, además, de unirse a la sustancia biológicamente activa ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que el tamaño de partícula se regula a través del al menos un gen inducible, de manera que las partículas polímeras formadas tienen un diámetro de 10 nm hasta 3  $\mu$ m, preferentemente un diámetro de 10 nm hasta 900 nm y, de forma especialmente preferida, un diámetro de 10 nm hasta 100 nm.
- 25 5. Procedimiento para la preparación de partículas polímeras biodegradables, que comprende:
- a) Disponer una célula, en la que se ha incorporado al menos un gen, en donde el gen codifica una polímero-sintasa;
- 30 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 35 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento; y
- b) Cultivo de la célula en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para la preparación de las partículas polímeras biodegradables por parte de la célula.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula se cultiva en presencia de al menos una sustancia biológicamente activa y/o un colorante, en donde el colorante se selecciona de Rojo Nilo y Rhodamin 123.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se desintegran las células cultivadas y, a continuación, se separan las partículas polímeras de los restos celulares.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que se separa de las partículas polímeras una capa lipídica que se encuentra en la superficie de la partícula polímera y se sustituye con una capa lipídica de distinta composición.
- 45 9. Procedimiento para la preparación *in vitro* de partículas polímeras biodegradables, que comprende:
- a) Disponer una solución apropiada para la formación de partículas polímeras con al menos un sustrato;
- b) Incorporar a la solución una proteína que es adecuada para controlar el tamaño de la partícula polímera; y
- c) Incorporar al menos una polímero-sintasa,

- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 5 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la proteína que controla el tamaño es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o en el que la proteína que controla el tamaño tiene, además, la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la al menos una polímero-sintasa comprende un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, o procedimiento según la reivindicación 10, en el que la al menos una polímero-sintasa y la proteína que controla el tamaño comprenden, respectivamente, un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, en donde el al menos un dominio de fijación tiene, además, la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa y/o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 15 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la al menos una polímero-sintasa se selecciona del grupo que comprende las polímero-sintasas de *R. eutropha*, *P. oleovorans*, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas punctata* y *Thiocapsa pfennigii*, o en donde la al menos una polímero-sintasa es phaC de *Ralstonia eutropha*.
- 20 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la célula es un microorganismo que se selecciona de las especies siguientes: *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Halobiforma*, o en el que la célula se encuentra en el microorganismo que se selecciona del grupo que comprende los siguientes: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* o *Halobiforma haloterrestris*.
- 25 14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4 o 9 a 11, en el que la proteína que controla el tamaño de la partícula polímera se obtiene a partir de la familia de proteínas similares a la fasina, incluidas la fasina de *Ralstonia eutropha* y la fasina de *Pseudomonas oleovorans*.
- 30 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 u 11, en el que el al menos un dominio de fijación que tiene, además, la capacidad de unirse a sustancias biológicamente activas y/o al reactivo de acoplamiento, se selecciona del grupo que comprende oligopéptidos, enzimas, abzimas, proteínas no catalíticas, epítomos FLAG o al menos un resto cisteína.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la sustancia biológicamente activa comprende una sustancia farmacéuticamente activa.
17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la proteína biológicamente activa o la sustancia biológicamente activa es un oligopéptido, una enzima, una abzima, una proteína no catalítica o un anticuerpo.
- 35 18. Procedimiento para la preparación *in vitro* de partículas polímeras biodegradables, que comprende:
- a) Disponer una solución apropiada para la formación de partículas polímeras con al menos un sustrato;
  - b) Incorporar a la solución al menos una polímero-sintasa,
- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- 40 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
19. Partícula polímera con al menos una polímero-sintasa,
- 45 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o

- en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 5 20. Partícula polímera según la reivindicación 19, adicionalmente con al menos una proteína, en donde la proteína se selecciona del grupo que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímero, una polímero-sintasa y una proteína que controla el tamaño de partícula,
- en donde la al menos una proteína es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una proteína es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 10 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
21. Partícula polímera según la reivindicación 19 o 20, preparada según uno de los procedimientos descritos en las reivindicaciones 1 a 16.
- 15 22. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 o 20, en la que se forma alrededor de la partícula polímera una capa de fosfolípidos y la composición de la capa de fosfolípidos influye sobre el transporte de la partícula a través de una membrana biológica.
- 20 23. Partícula polímera según la reivindicación 19, en la que la al menos una polímero-sintasa comprende un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, o partícula polímera según la reivindicación 20, en la que la al menos una polímero-sintasa y la al menos una proteína comprenden, respectivamente, un dominio de fijación de partículas polímeras y al menos un dominio de fijación, en donde el al menos un dominio de fijación tiene la capacidad de unirse a la sustancia biológicamente activa y/o a un reactivo de acoplamiento.
24. Partícula polímera según la reivindicación 23, en la que la al menos una polímero-sintasa, o la al menos una polímero-sintasa y la al menos una proteína, está/n unida/s a la partícula polímera a través del dominio de fijación de partículas polímeras.
- 25 25. Partícula polímera según la reivindicación 23, en la que la sustancia biológicamente activa y/o el reactivo de acoplamiento está/n unida/os al dominio de fijación.
26. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 23 a 25, en la que el al menos un dominio de fijación se selecciona del grupo que comprende oligopéptidos, enzimas, abzymas, proteínas no catalíticas, epítopos FLAG y al menos un resto cisteína.
- 30 27. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 23 a 26, en la que el al menos un dominio de fijación se genera modificando químicamente la al menos una polímero-sintasa o la al menos una proteína, o tanto la al menos una polímero-sintasa como la al menos una proteína, con un reactivo de acoplamiento.
- 35 28. Partícula polímera según la reivindicación 27, en la que la modificación química comprende la unión de al menos un reactivo de acoplamiento a la al menos una polímero-sintasa o a la al menos una proteína, o tanto a la al menos una polímero-sintasa como a la al menos una proteína, en donde esta se selecciona del grupo que comprende cloruro del ácido bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfónico (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBroP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBOP), N-hidroxi-succinimida-biotina, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), dicitclohexil-carbodiimida, carbonato de disuccinimidilo, 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC), bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfina, diisopropil-carbodiimida (DIPC), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotrioxazolil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboxiimido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), éster p-nitrofenílico del ácido clorofórmico, y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).
- 40 29. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 28, en la que se incorpora al menos una sustancia farmacéuticamente activa y/o un colorante en la partícula polímera, en donde el colorante se selecciona de Rojo Nilo y Rhodamin 123.
- 45 30. Partícula polímera según la reivindicación 29, en la que la sustancia farmacéuticamente activa y/o el colorante se liberan por difusión o degradación de la partícula polímera.
31. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 30, en la que la sustancia biológicamente activa comprende una sustancia farmacéuticamente activa.
- 50 32. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 30, en la que la sustancia biológicamente activa se selecciona del grupo que comprende dideoxiinosina, floxuridina, 6-mercaptopurina, doxorubicina, daunorrubicina, 1-darubicina, cisplatino, metotrexato, taxol, antibióticos, anticoagulantes, germicidas, agentes antiarrítmicos y precursores de sustancias activas y derivados de las mismas, o del grupo que comprende insulina, calcitonina, ACTH, glucagón,

- somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, factores de liberación del hipotálamo, prolactina, tirotropina, endorfinas, encefalinas, vasopresinas, opiáceos sintéticos, superóxido-dismutasa, anticuerpos, interferones, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, tripsina, quimotripsina y pepsina.
- 5 33. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 31, en la que la proteína biológicamente activa se selecciona del grupo que comprende insulina, calcitonina, ACTH, glucagón, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, factores de liberación del hipotálamo, prolactina, tirotropina, endorfinas, encefalinas, vasopresinas, opiáceos sintéticos, superóxido-dismutasa, anticuerpos, interferones, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, tripsina, quimotripsina y pepsina.
- 10 34. Partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 31, en la que la proteína biológicamente activa o la sustancia biológicamente activa es un oligopéptido, una enzima, una abzima, una proteína no catalítica, o un anticuerpo.
35. Uso de una partícula polímera con al menos una polímero-sintasa  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- 15 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que está unida directamente a una sustancia biológicamente activa o a través de un reactivo de acoplamiento, o  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que está unida directamente a una sustancia biológicamente activa o a través de un reactivo de acoplamiento,  
 para la preparación de un medicamento, un pesticida o un herbicida.
- 20 36. Uso de una partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 34 para la preparación de un medicamento apropiado para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.
37. Medicamento, pesticida o herbicida, que comprende una partícula polímera con al menos una polímero-sintasa,  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- 25 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que está unida directamente a una sustancia biológicamente activa o a través de un reactivo de acoplamiento, o  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que está unida directamente a una sustancia biológicamente activa o a través de un reactivo de acoplamiento.
- 30 38. Medicamento que comprende una partícula polímera según una de las reivindicaciones 19 a 34, para usar en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.
39. Procedimiento para la fijación de una sustancia biológicamente activa, que comprende:
- a) Preparación de una o múltiples partículas polímeras con al menos una polímero-sintasa,  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- 35 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea directamente o a través de un reactivo de acoplamiento, o  
 en donde la al menos una polímero-sintasa es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa, ya sea de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, y
- 40 b) Poner en contacto la partícula polímera con una muestra que comprende una sustancia biológicamente activa, de forma que la proteína biológicamente activa o la al menos una polímero-sintasa se una a la sustancia biológicamente activa.
40. Procedimiento según la reivindicación 39, en el que la sustancia biológicamente activa comprende una sustancia farmacéuticamente activa.
- 45 41. Procedimiento según la reivindicación 39, en el que la proteína biológicamente activa se selecciona del grupo que comprende insulina, calcitonina, ACTH, glucagón, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, factores de liberación del hipotálamo, prolactina, tirotropina, endorfinas, encefalinas, vasopresinas, opiáceos sintéticos, superóxido-dismutasa, anticuerpos, interferones, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, tripsina, quimotripsina y pepsina.

42. Procedimiento según la reivindicación 39, en el que la proteína biológicamente activa o la sustancia biológicamente activa es un oligopéptido, una enzima, una abzima, una proteína no catalítica, o un anticuerpo.
- 5 43. Procedimiento según la reivindicación 39, en el que la al menos una polímero-sintasa comprende un dominio de fijación de partículas polímeras y un dominio de fijación que, además, tiene la capacidad de unirse a la sustancia biológicamente activa y/o al reactivo de acoplamiento.
44. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que el al menos un dominio de fijación se selecciona del grupo que comprende oligopéptidos, enzimas, abzimas, proteínas no catalíticas, epítotos FLAG o, al menos, un resto cisteína.
- 10 45. Procedimiento según la reivindicación 43, en el que el al menos un dominio de fijación se genera modificando químicamente la al menos una polímero-sintasa en la superficie de la partícula polímera con un reactivo de acoplamiento.
- 15 46. Procedimiento según la reivindicación 45, en el que la modificación química comprende la unión de al menos un reactivo de acoplamiento a la al menos una polímero-sintasa, en donde el reactivo de acoplamiento se selecciona del grupo que comprende cloruro del ácido bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfónico (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBroP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidin-fosfonio (PyBOP), N-hidroxi-succinimida-biotina, hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), dicitclohexil-carbodiimida, carbonato de disuccinimidilo, 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etil-carbodiimida (EDC), bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)-fosfina, diisopropil-carbodiimida (DIPC), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotrioxazolil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboxiimido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), éster p-nitrofenílico del ácido clorofórmico, y tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).
- 20 47. Partícula, uso o composición farmacéutica, pesticida o herbicida según las reivindicaciones 31, 35, 36, 37 o 38, en donde la partícula tiene un diámetro de 10 nm hasta 3  $\mu$ m, 10 nm hasta 100 nm, o 50 nm hasta 500 nm.
- 25 48. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que se incorpora en la célula al menos un gen adicional, que codifica una proteína, en donde la proteína se selecciona del grupo que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímero, una polímero-sintasa y una proteína que controla el tamaño de partícula,
- en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 30 en donde la al menos una proteína adicional es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
49. Uso según las reivindicaciones 35 o 36, en el que adicionalmente la partícula polímera comprende al menos una proteína adicional, en donde la proteína se selecciona del grupo que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímero, una polímero-sintasa y una proteína que controla el tamaño de partícula,
- 35 en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 40 en donde la al menos una proteína adicional es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.
50. Medicamento, pesticida o herbicida según las reivindicaciones 37 o 38, en el que adicionalmente la partícula polímera comprende al menos una proteína adicional, en donde la proteína adicional se selecciona del grupo que comprende una polímero-depolimerasa, un regulador de polímero, una polímero-sintasa y una proteína que controla el tamaño de partícula,
- 45 en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión, que comprende una proteína biológicamente activa, o
- en donde la al menos una proteína adicional es una proteína de fusión que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento, o
- 50 en donde la al menos una proteína adicional es una proteína modificada que, además, tiene la capacidad de unirse a una sustancia biológicamente activa de forma directa o a través de un reactivo de acoplamiento.

Figura 1

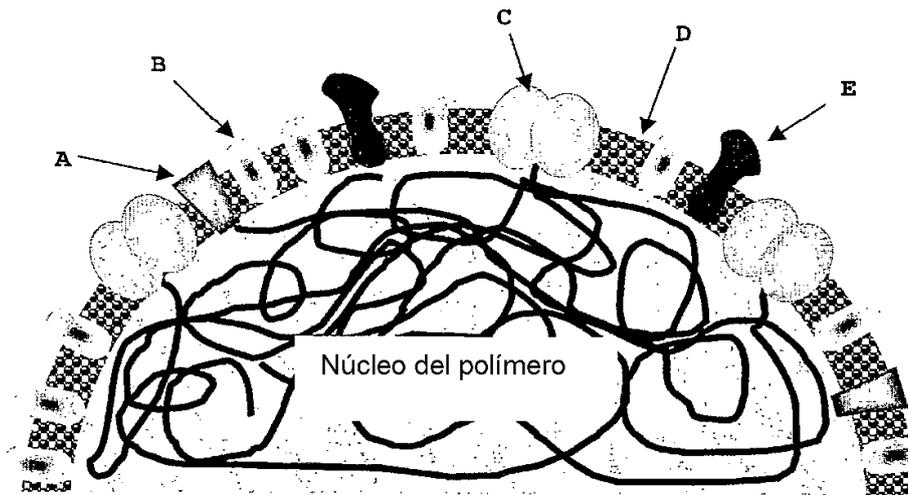


Figura 2

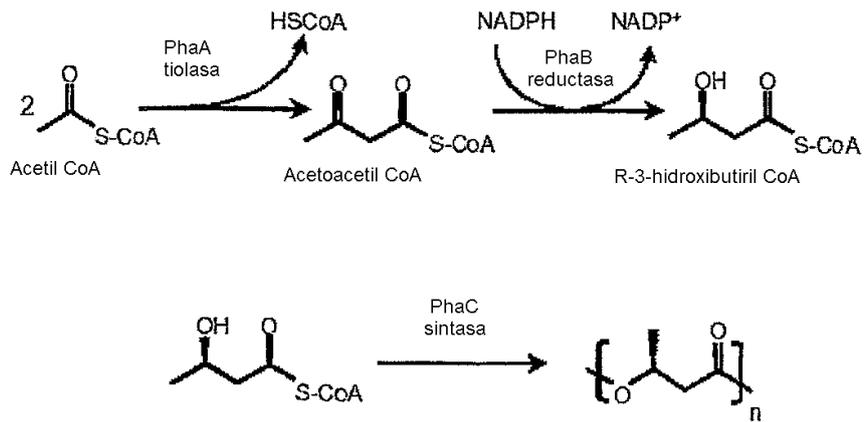


Figura 3

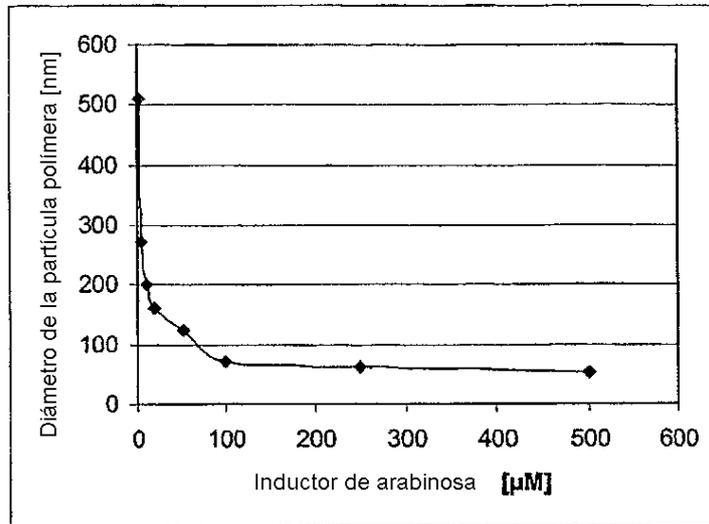


Figura 4

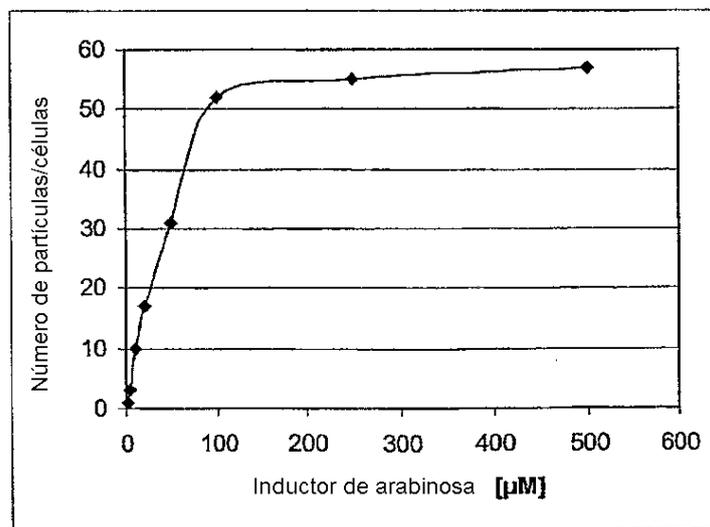


Figura 5

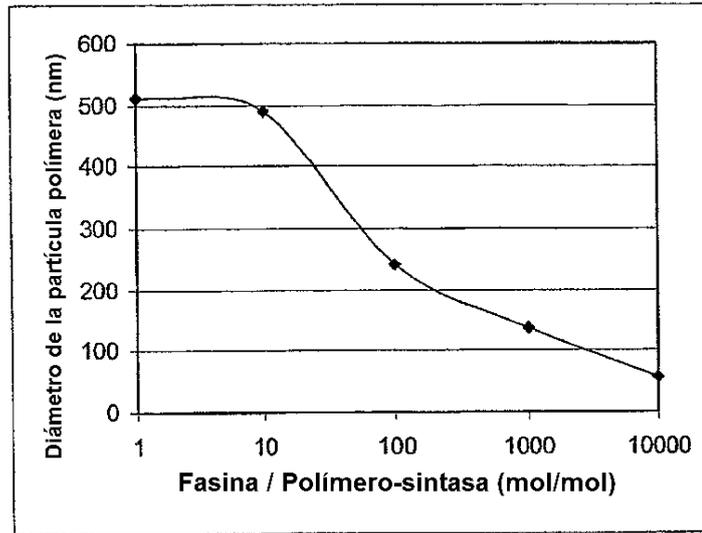


Figura 6

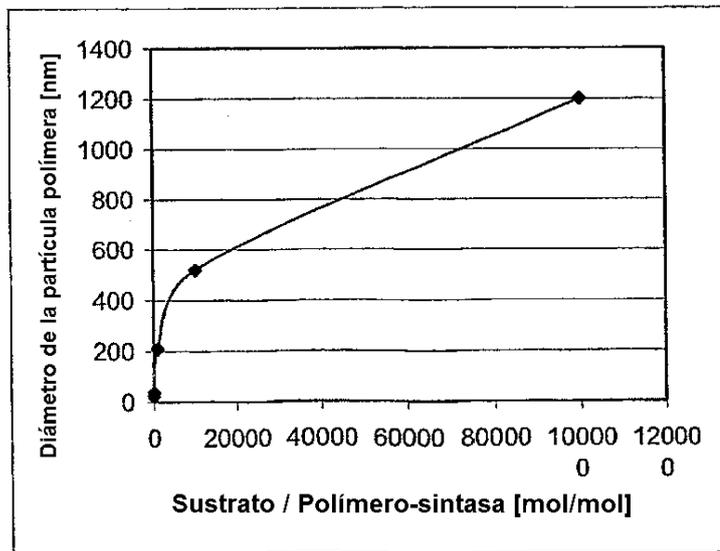


Figura 7

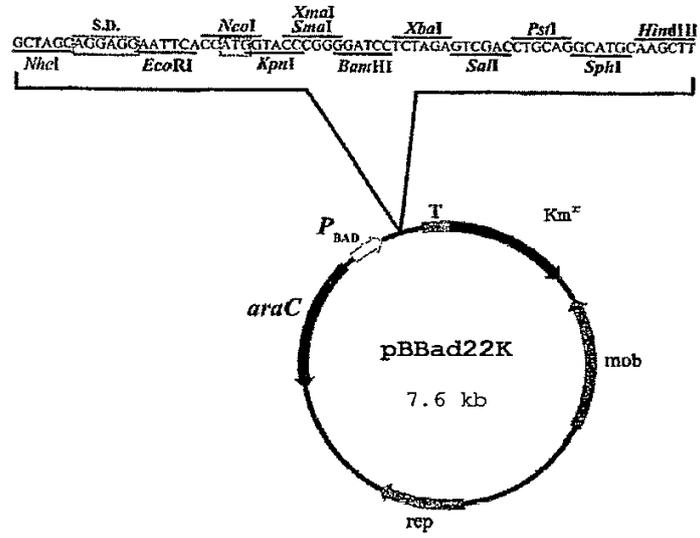


Figura 8

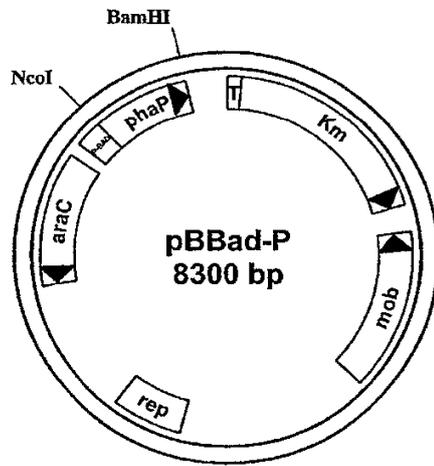


Figura 9

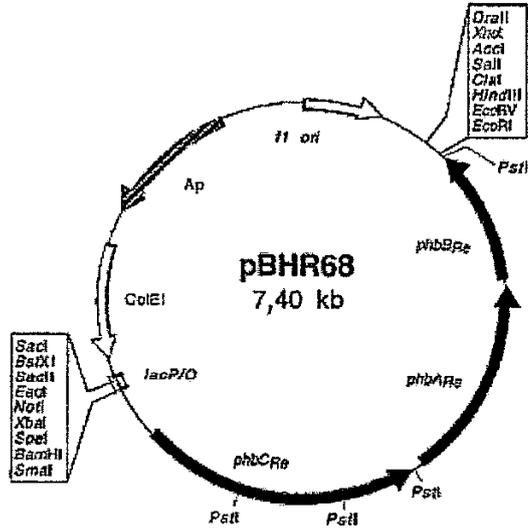


Figura 10

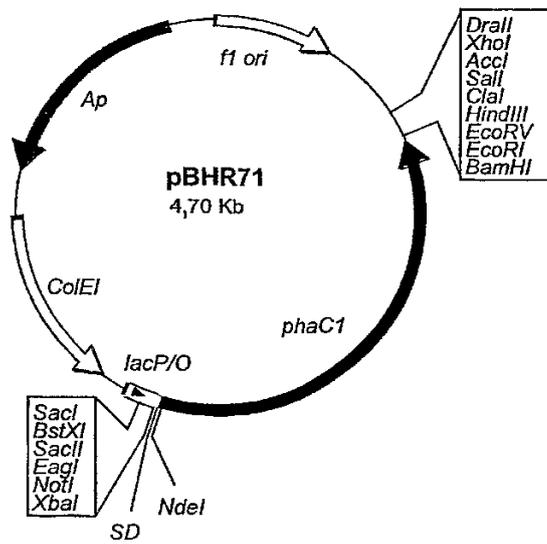


Figura 11

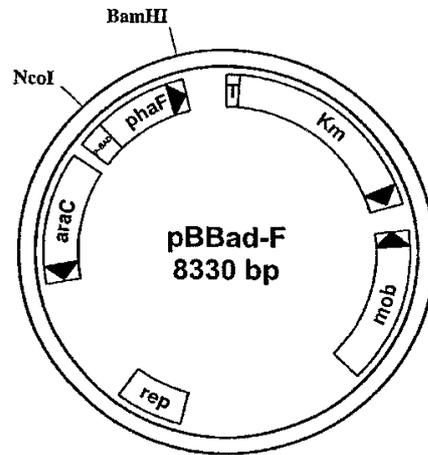


Figura 12

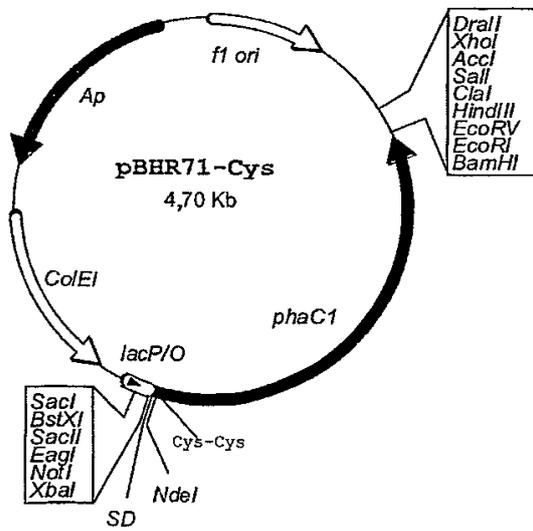


Figura 13

