(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 439 167**

(21) Número de solicitud: 201230972

(51) Int. Cl.:

***A61K 49/14*** (2006.01)
***A61K 49/18*** (2006.01)
***G01N 33/53*** (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

**21.06.2012**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**21.01.2014**

(71) Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**
**Serrano, nº 117**
**28006 Madrid ES**

(72) Inventor/es:

**VÉLEZ TIRADO, Marisela y**
**DAICH, Julian**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

(54) Título: **Compuestos con funcionalidad magnética, implantes o geles derivados de ellos, y el uso de ambos para determinar la actividad enzimática de una enzima**

(57) Resumen:

Compuestos con funcionalidad magnética, implantes o geles derivados de ellos, y el uso de ambos para determinar la actividad enzimática de una enzima.
Implante o gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas. Así como, compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas, preferiblemente sin recubrimiento o modificación de superficie o funcionalizadas con grupos carboxílicos, para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular. Preferiblemente el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico y las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

ES 2 439 167 A1

## DESCRIPCIÓN

Compuestos con funcionalidad magnética, implantes o geles derivados de ellos, y el uso de ambos para determinar la actividad enzimática de una enzima

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética. Estos implantes o geles pueden utilizarse para determinar la actividad enzimática asociada con la regeneración de la matriz celular a través de la medición de la variación en las propiedades magnéticas de al menos uno de los compuestos con funcionalidad magnética, en las propiedades magnéticas de uno o más de sus productos de degradación, o en ambos.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a nuevos compuestos con funcionalidad magnética que comprenden un sustrato de al menos una enzima, preferiblemente colágeno, condroitin sulfato o ácido hialurónico, y una pluralidad de partículas magnéticas sin recubrimiento o modificación de superficie, o funcionalizadas con grupos carboxílicos.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas. En las reacciones enzimáticas las moléculas sobre las que actúa una enzima se denominan sustratos y son convertidas por las enzimas en moléculas diferentes denominados metabolitos. Las enzimas son en general muy específicas respecto a las reacciones y sustratos que catalizan.

La importancia de las enzimas se demuestra por el hecho de que una enfermedad letal puede ser causada por el mal funcionamiento de un solo tipo de enzima de los miles de tipos presentes en el organismo.

Varias condiciones clínicas, como la placa inestable, la metástasis o variaciones en la regeneración de tejidos están relacionadas con trastornos enzimáticos.

La mayoría del material biológico es de naturaleza diamagnética, en otras palabras posee una susceptibilidad magnética negativa. Las partículas magnéticas unidas a una macromolécula de origen biológico pueden producir una firma magnética diferente a la de la propia macromolécula de origen biológico. Esta firma magnética es función de la composición, tamaño y la forma de las partículas. La magnetización de un determinado material se define como su momento magnético medio por unidad de volumen y está determinada por la estructura interna y composición de dicho material. Entre los ejemplos de partículas magnéticas están las partículas paramagnéticas, superparamagnéticas y ferromagnéticas; las cuales se utilizan comúnmente como agentes de contraste en forma de partículas individuales, microencapsuladas en matrices o unidas a otras moléculas. Estos agentes de contraste magnéticos están diseñados para mantener sus propiedades magnéticas constantes durante las mediciones y producir efectos de imagen de acuerdo a su concentración y distribución en los diferentes tejidos y compartimentos del cuerpo. Ciertos factores en la distribución de las partículas magnéticas como la agregación o recubrimientos en su superficie pueden afectar los efectos de contraste que las mismas producen.

En la actualidad la detección y/o seguimiento de procesos enzimáticos que pueden estar relacionados con trastornos o enfermedades se suele realizar mediante biopsias, extracciones o métodos indirectos como la estimación de niveles de enzimas y metabolitos. Existe hoy en día una necesidad de un desarrollar un producto que permita el seguimiento de la actividad enzimática in situ, sin necesidad de extraer la muestra del organismo objeto de estudio, utilizando métodos de detección no invasivos que preserven la integridad del organismo.

En esta solicitud de patente se entiende por “compuesto con funcionalidad magnética” como aquel con la capacidad de sufrir cambios conformacionales o estructurales que dan lugar a una variación medible de sus propiedades magnéticas, en las propiedades magnéticas de uno o más de sus productos de degradación, o en ambos.

La solicitud de patente US 2011/0182815 A1 (Daich, J.) describe métodos de diagnosis utilizando sustratos modificados para tener funcionalidad magnética. Dichos sustratos se obtienen a partir de la combinación de los mismos con partículas magnéticas de forma que al ser estos sustratos con funcionalidad magnética digeridos por las enzimas de interés se produce un cambio medible en la distribución de las partículas magnéticas. Sin embargo, la solicitud de patente US 2011/0182815 A1 solo menciona formulaciones farmacéutica que incluyen métodos intravenosos y de encapsulación como formas de envío de dichos sustratos modificados para tener funcionalidad magnética que no son eficientes para alcanzar ciertos tipos de tejido conectivo como pueden ser

distintos cartílagos articulares. Entre los ejemplos de dicha solicitud de patente solo se menciona la utilización de ciertas proteínas como sustratos para la obtención de compuestos con funcionalidad magnética, dejando de lado la utilización de otros elementos como los glicoaminglicanos que son parte y cumplen funciones como la hidratación, flexibilidad y promoción de regeneración de la matriz extracelular. Estas funciones son significativamente importantes para la matriz extracelular y por ende también para el tejido conectivo. Los procedimientos de modificación de sustratos para obtener los compuestos de dicha aplicación están limitados a la existencia de grupos carboxilo en los primeros quedando de esta forma excluidos un amplio número de sustratos que no poseen dichos grupos carboxilos disponibles para modificar. Entre estos últimos, los glicoaminglicanos comentados anteriormente.

Por otro lado, los compuestos con funcionalidad magnética y los métodos para la obtención de los mismos descritos en la solicitud de patente US 2011/0182815 A1 están basados en la utilización de partículas magnéticas con modificaciones de superficie, las cuales facilitan el anclaje de dichas partículas magnéticas a los sustratos de interés. Dichas modificaciones de superficie se efectúan con materiales diamagnéticos, dando lugar a una disminución en la intensidad y alcance del campo magnético que estas partículas con modificaciones de superficie generan en su entorno. Por lo tanto, al incorporarse dichas modificaciones de superficie a las partículas magnéticas puede disminuir la interacción entre los momentos magnéticos de las distintas partículas, resultando estos fenómenos desventajosos para el tipo de mediciones utilizadas en métodos de detección como la resonancia magnética nuclear propuestos en la mencionada solicitud de patente americana.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas.

En la solicitud de patente US 2011/0182815 A1 no se menciona ni sugiere la utilización de los sustratos modificados para fabricar un implante o geles, así como tampoco se menciona ni sugiere el uso de dicho implante en el monitoreo de la actividad enzimática en el tejido conectivo. A diferencia de la divulgación contenida en esta solicitud de patente americana, la utilización de implantes o geles permite que la reacción enzimática tenga lugar en el mismo implante o gel, es decir, de forma predeterminadamente localizada.

Diversos tipos de implantes de tejido conectivo existen hoy en día. Estos implantes suelen incluir materiales biocompatibles, incluso pueden ser extracciones de tejidos de seres vivos o producidos mediante técnicas de cultivo. Las aplicaciones terapéuticas de estos implantes son muy diversas yendo desde, por ejemplo, la sustitución en la regeneración de tejido conectivo en articulaciones u ortodoncia. Las principales acciones terapéuticas de estos implantes son dar soporte, sustituir o provocar la regeneración de tejido del receptor. No existe hoy en día un método no invasivo de seguimiento in situ de la integración de implantes internos o de la regeneración de sus constituyentes por componentes generados por el organismo receptor.

Por otro lado, el gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente es adecuado para análisis in vitro y puede incluir adicionalmente los mismos materiales biocompatibles que un implante. Dichos geles comúnmente se utilizan para simular el ambiente de la matriz extracelular y tienen variadas aplicaciones en investigación y diagnosis.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas para fabricar un implante o un gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular en un ser humano u otro ser vivo.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de dicho compuesto con funcionalidad magnética para fabricar un implante o un gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en el procedimiento de regeneración de la matriz extracelular en un ser humano u otro ser vivo. Tras la colocación del implante descrito en la presente invención, el compuesto con funcionalidad magnética comprendido en él puede reaccionar con al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular, dando lugar a una variación medible en sus propiedades magnéticas, en las propiedades magnéticas de uno o más de sus productos de degradación, o en ambos. De esta forma, la presente invención proporciona un implante que permite monitorizar la regeneración de la matriz extracelular en dicho implante sin necesidad de realizar biopsias.

La presente invención también se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, caracterizado dicho compuesto porque:

i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o
ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos.

Tras la administración del compuesto con funcionalidad magnética de la presente invención, éste puede reaccionar con al menos una enzima dando lugar a una variación medible en su funcionalidad magnética. De esta forma se puede utilizar el compuesto con funcionalidad magnética de la presente invención para la detección de una actividad enzimática, en particular aquella implicada en la regeneración de la matriz extracelular.

También es objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento ventajoso para la obtención de un compuesto con funcionalidad magnética donde las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, dicho procedimiento comprende:
a) modificar el sustrato de al menos una enzima, e
b) inmovilizar una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie en el compuesto modificado obtenido en la etapa a).

A diferencia de otros procedimientos conocidos en el estado de la técnica en los que las partículas magnéticas están recubiertas o presentan alguna modificación de superficie, el procedimiento de obtención de un compuesto con funcionalidad magnética de esta invención permite unir el sustrato de la enzima a partículas magnéticas que son casi en su totalidad núcleo magnético en sí.

En realizaciones preferidas de la presente invención, las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

En otras realizaciones preferidas de la presente invención, el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glicoaminglicano y mezclas de éstos, siendo más preferible que dicho sustrato se seleccione del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, donde dicho compuesto con funcionalidad magnética se obtiene por el procedimiento descrito en esta solicitud de patente. Preferiblemente, las partículas magnéticas son nanopartículas de magnetita, y el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

La presente invención también se refiere a un producto que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde
i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o
ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, donde dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un implante, un gel, una composición farmacéutica y un agente de contraste.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un producto que se selecciona del grupo que consiste en un implante y un gel, y éste comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en el procedimiento de regeneración celular y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente. En una realización aún más preferible, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y las partículas magnéticas son nanopartículas de magnetita sin recubrimiento o modificación de superficie.

La presente invención también se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un producto tal como se describe en esta solicitud de patente para determinar la actividad enzimática de una o más enzimas. Preferiblemente, para detectar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad enzimática de al menos una enzima.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que

comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar el implante o el gel tal como se describe en esta solicitud de patente para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular en un ser humano u otro ser vivo.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La presente invención hace uso, entre otros principios, del hecho que las propiedades de los materiales magnéticos se derivan de la distribución y forma de sus componentes. Si se logra alterar alguna de estas dos características mediante la actividad enzimática es posible detectar la misma en función de la medición de las propiedades magnéticas. Una forma de hacer esto último es provocar la agregación de partículas como consecuencia de la actividad enzimática. Para entender el efecto de la agregación de partículas magnéticas se da en primer lugar una descripción general de las propiedades de los diferentes tipos de materiales magnéticos que pueden componerlas.

Los materiales ferromagnéticos en general contienen metales de transición como, por ejemplo, hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), cobalto (Co), níquel (Ni), zinc (Zn) y cobre (Cu). Los materiales ferromagnéticos se caracterizan también por estar formados por grupos de unos $10^{17}$ a $10^{21}$ átomos llamados dominios magnéticos, teniendo todos ellos sus momentos magnéticos (o poblaciones de espín) que apuntan en la misma dirección. Los momentos magnéticos de los dominios están orientados al azar en los materiales no magnetizados, y apuntan en direcciones preferidas en materiales magnetizados. La capacidad de los materiales ferromagnéticos de seguir estando magnetizados cuando se retira un campo magnético externo es un factor distintivo en comparación con los materiales paramagnéticos, superparamagnéticos y diamagnéticos que pierden su orientación preferida de magnetización en circunstancias similares.

Ciertos materiales paramagnéticos pueden presentar una magnetización permanente y estable después de retirar el campo magnético si se encuentran por debajo de la llamada temperatura de Curie, temperatura de transición por debajo de la cual los espines se alinean en forma estable a favor o en contra del campo magnético. Estos materiales se llaman antiferomagnéticos y presentan una magnetización resultante debida a que las dos orientaciones de los espines no se cancelan. Por encima de la temperatura de Curie, dada que la interacción de los espines es débil, al retirar a campo magnético externo la agitación térmica es suficiente para que los espines adquieran una orientación aleatoria eliminando así la magnetización permanente. Todas las partículas de hierro compuestas a base de magnetita poseen propiedades ferrimagnéticas o ferromagnéticas a temperaturas fisiológicas (la temperatura de transición de las partículas de hierro está cerca de 850 Kelvin).

Los materiales superparamagnéticos pueden estar constituidos por dominios individuales de materiales que a granel poseen propiedades ferromagnéticas. Su susceptibilidad magnética, el grado de magnetización de un material, en respuesta a un campo magnético, se encuentra entre la de los materiales ferromagnéticos y paramagnéticos. Los materiales superparamagnéticos se comportan como materiales ferromagnéticos bajo los efectos de campos magnéticos externos, pero tienen características paramagnéticas en ausencia de un campo magnético externo. Estos materiales superparamagnéticos generalmente están formados por partículas cristalinas nanométricas, y a escala macroscópica tienen propiedades ferromagnéticas o de imanes nanocompuestos.

El concepto de anisotropía es importante para entender el superparamagnetismo. Los espines de un gran número de iones paramagnéticos dispuestos de manera ordenada interactúan de forma que cuando se coloca en un campo externo, la magnetización resultante se orienta en todas las direcciones, es decir, es isótropa. Cuando el acoplamiento de los espines se alinea en alguna dirección en relación con un campo externo entonces se dice que la magnetización es anisótropa. Por ejemplo, para los cristales de magnetita hay seis ejes de orientación. Así, bajo el efecto de un campo magnético, el resultado sería de seis orientaciones, cada una con un valor de energía diferente. Las energías mínimas se dan cuando la orientación es paralela al campo externo, y máximas cuando la orientación es antiparalela.

La temperatura tiene un efecto desestabilizador en el magnetismo de los materiales superparamagnéticos. La energía térmica evita la alineación de los momentos magnéticos presentes en las partículas superparamagnéticas. Después de la retirada de un campo magnético aplicado, los momentos magnéticos de los materiales superparamagnéticos todavía existen pero el rápido movimiento inducido por la temperatura los desalinea. A las temperaturas de los sistemas biológicos y en los campos magnéticos aplicados de la imagen por resonancia magnética (RMI), los materiales superparamagnéticos son menos magnetizables que sus homólogos ferromagnéticos.

Ciertas propiedades magnéticas, por ejemplo el ferro- o ferri- magnetismo, surgen del comportamiento cooperativo de los dominios a escalas macroscópicas y no son intrínsecas a las moléculas o iones que componen el material. Estas propiedades son consecuencia de las interacciones entre las moléculas o iones y, por lo tanto, los métodos para predecir, controlar y modular la estructura de estado sólido son relevantes para la comprensión y manipulación de dicho comportamiento.

Algunos nanomateriales, como las nanopartículas de magnetita en suspensión coloidal, exhiben ciertas propiedades diferentes a las que poseen en estado sólido a escalas macroscópicas, ya sea a granel o como partículas individuales. Para los materiales formados por cristales de gran tamaño, diámetros mayores de 15 nm, los espines se alinean y subdividen dentro de pequeños dominios magnéticos llamados dominios de Weiss. Las direcciones de los distintos espines tienden a alinearse en el mismo sentido a lo largo de los ejes anisotrópicos; esto lleva a alcanzar un valor mínimo de la energía de anisotropía y el sistema puede considerarse isótropo. Esto explica por qué los cristales ferromagnéticos, por ejemplo de magnetita, deben ser magnetizados mediante la colocación en un campo externo a fin de obtener el magnetismo permanente. Si los cristales del material magnético son más pequeños que los dominios de Weiss se puede observar superparamagnetismo. Para que el espín pueda pasar de un eje anisotrópico a otro se requiere de una entrada de energía igual a la transición deseada. La energía de anisotropía se conoce como KV donde K es la constante de anisotropía y V es el volumen de cristal. La distancia entre varias partículas cristalinas influye al valor de KV ya que cristales muy próximos el uno al otro pueden permitir interacciones entre los espines que resultan en el aumento de KV. El giro de las direcciones de los espines a lo largo del eje de un campo externo aplicado se define como el tiempo de relajación Néel, y es el resultado de la agitación térmica de los cristales. La relajación de Néel ($\tau_N$) se puede expresar como:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV}{kT}}$$

Donde k es la Constante de Boltzmann, T es la temperatura constante del medio y $\tau_0$ es una constante. Para cristales grandes el tiempo de relajación de Néel es muy largo y los momentos magnéticos se pueden considerar como bloqueados al eje anisotrópico fácil. Para cristales de menos de 6 nm de diámetro, las transmisiones son rápidas del orden de nanosegundos. Para pequeños cristales ferrimagnéticos en medios líquidos no sólo es el tiempo de relajación Néel lo que modula las fluctuaciones, sino también el movimiento de los cristales. El tiempo Browniano o de la rotación media del sistema es igual a:

$$\tau_r = \frac{4\pi\alpha 3\eta}{3kT}$$

Donde α es el radio de la partícula y η la viscosidad del líquido. Para un sistema de cristales paramagnéticos la magnetización resultante la da la siguiente relación:

$$M = M_{sat} \cdot L(\alpha), \quad L(\alpha) = \coth(\alpha) - \frac{1}{\alpha}, \quad \alpha = \mu \frac{B_0}{kT}$$

Donde $B_0$ es el campo magnético externo, μ es el momento magnético total del cristal y $M_{sat}$ define el campo de cierre de la magnetización o de saturación a lo largo del eje de baja energía. Las partículas superparamagnéticas tienen momentos magnéticos mucho mayores que los momentos individuales asociados con los iones que forman los cristales por el hecho de que, en ausencia de un campo externo, el momento magnético medio de las partículas es cero debido el promedio de la relajación Néel de los cristales y la rotación de las partículas.

La presente invención se basa en que el comportamiento magnético de nanopartículas magnéticas depende de la distancia entre ellas y en que esa diferencia es medible experimentalmente. La distancia entre dichas nanopartículas magnéticas inmovilizadas en una matriz o en una macromolécula depende de la integridad de dicho soporte. Si esta integridad se ve alterada por el efecto de una enzima hidrolítica, por ejemplo, y si por tal efecto las partículas magnéticas se agregarán se dará lugar a una señal magnética distinta a la proveniente de las partículas presentes en una matriz o molécula intacta.

La presente invención se refiere a un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas, con la condición de que cuando

el implante o gel comprende más de un compuesto con funcionalidad magnética, éstos están situados en diferentes regiones.

Preferiblemente, cuando el implante o gel comprende más de un compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, estos están dispuestos en zonas separadas del implante o gel. La utilización de un implante o gel que comprenda más de un compuesto con funcionalidad magnética, comprendiendo cada uno de ellos un sustrato diferente puede permitir realizar el seguimiento simultaneo de diferentes enzimas.

A los efectos de la presente invención, por “pluralidad de partículas magnéticas” se entiende más de una partícula no diamagnética; entendiéndose así mismo “partícula” como una combinación de moléculas o iones, ordenadas preferiblemente en forma de cristal, con un tamaño micrométrico o inferior, preferiblemente con un tamaño inferior a 100 nm de diámetro.

Por otro lado, en la presente invención se entiende por “compuesto con funcionalidad magnética” como aquel compuesto con la capacidad de producir cambios conformacionales o estructurales que dan lugar a una variación medible de sus propiedades magnéticas, en las propiedades magnéticas de uno o más de sus productos de degradación, o en ambos.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al implante o gel que comprende un compuesto con funcionalidad magnética que a su vez comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al implante o gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que a su vez comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas. Preferiblemente, las partículas superparamagnéticas pueden ser nanopartículas de ferritas, como por ejemplo, magnetita, maghemita, ferritas de cobalto, plata o magnesio.

En una realización aún más preferible, las partículas superparamagnéticas son nanopartículas de magnetita, siendo especialmente preferible que las nanopartículas de magnetita tengan un diámetro inferior a 15 nm.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al implante o gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que a su vez comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glucosaminoglicano y una combinación de éstos.

Preferiblemente, dicho sustrato reacciona con al menos una enzima que es una enzima dependiente del metal. En una realización más preferible, esta enzima se selecciona del grupo que consiste en una proteasa, una oxidasa y una sulfatasa. De forma aún más preferible, esta enzima se selecciona del grupo que consiste en la hialuronidasa y una metaloproteasa.

En una realización especialmente preferible, el sustrato comprendido en el compuesto con funcionalidad magnética descrito en esta solicitud de patente reacciona con al menos una enzima que es una metaloproteasa de matriz (MMP), siendo especialmente preferible que esta enzima se seleccione del grupo que consiste en una colagenasa y una gelatinasa.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al implante o gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos. Preferiblemente, el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

En una realización especialmente preferible, el implante o gel comprende un compuesto con funcionalidad magnética, las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas, preferiblemente nanopartículas de magnetita, y el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

La presente invención también se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas, para fabricar un implante o un gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular. Cuando el producto fabricado sea un implante, este puede utilizarse para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular en un ser humano u otro ser vivo. Por otro lado, cuando el producto fabricado es un gel, éste puede utilizarse para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular in vitro.

Preferiblemente, las partículas magnéticas pueden ser partículas superparamagnéticas y, más preferiblemente, nanopartículas de magnetita.

En una realización preferida, el sustrato comprendido en el compuesto con funcionalidad magnética para fabricar el implante o gel tal como se describe en el párrafo anterior, se puede seleccionar del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glucosaminoglicano y una combinación de éstos.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos. Preferiblemente, el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

En una realización especialmente preferible, las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas, preferiblemente nanopartículas de magnetita, y el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

El colágeno tiene una estructura compleja. Su proteína precursora (monómero) se denomina tropocolágeno y mide alrededor de 300 nanómetros de longitud y 1,4 nm de diámetro. El tropocolágeno está formado por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa, que a su vez se entrecruzan para formar una estructura helicoidal triple. Cada cadena α es un polipéptido formado por la repetición de tripletes que contienen en su conjunto aminoácidos glicina y es muy rico en prolina e hidroxiprolina. La hidroxiprolina represente entre 10 y el 12% del total de la composición de los residuos de colágeno, dependiendo dicho porcentaje del tipo de colágeno. Cada cadena tiene un peso molecular de alrededor de 100.000 Da.

Existen diferentes tipos de colágenos determinados por diferencias en la composición de sus cadenas alfa:

Colágeno tipo I: Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena alfa1 y al otro, cadena alfa2. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.

Colágeno tipo II: Se encuentra sobre todo en el cartílago, pero también se presenta en la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. En el cartílago forma fibrillas finas de 10 a 20 nanómetros, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I. Están constituidas por tres cadenas alfa2 de un único tipo. Es sintetizado por el condroblasto. Su función principal es la resistencia a la presión intermitente.

Colágeno tipo III: Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Parece un constituyente importante de las fibras de 50 nanómetros que se han llamado tradicionalmente fibras reticulares. Está constituido por una clase única de cadena alfa3. Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos, glía. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.

Colágeno tipo IV: Es el colágeno que forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Es un colágeno que no se polimeriza en fibrillas, sino que forma un filtro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminina y fibronectina. Es sintetizado por las células epiteliales y endoteliales. Su función principal es la de sostén y filtración.

Colágeno tipo V: Presente en la mayoría del tejido intersticial. Se asocia con el tipo I.

Colágeno tipo VI: Presente en la mayoría del tejido intersticial. Sirve de anclaje de las células en su entorno. Se asocia con el tipo I.

Colágeno tipo VII: Se encuentra en la lámina basal.

Colágeno tipo VIII: Presente en algunas células endoteliales.

Colágeno tipo IX: Se encuentra en el cartílago articular maduro. Interactúa con el tipo II.

Colágeno tipo X: Presente en cartílago hipertrófico y mineralizado.

Colágeno tipo XI: Se encuentra en el cartílago. Interactúa con los tipos II y IX.

Colágeno tipo XII: Presente en tejidos sometidos a altas tensiones, como los tendones y ligamentos. Interactúa con los tipos I y III.

Colágeno tipo XIII: Es ampliamente encontrado como una proteína asociada a la membrana celular. Interactúa con los tipos I y III.

Colágeno tipo XIV: No fibrilar y muy similar al tipo XII, se encuentra presente en la epidermis fetal y tendones.

El colágeno, de hecho, es el sustrato de varias enzimas de la familia de las metaloproteasas de matriz (MMPs) que desempeñan varias de las principales funciones en la construcción y renovación de los tejidos. Por lo tanto la determinación de la actividad colagenolítica en vivo de dichas enzimas, llamadas a menudo colagenasas, es de gran interés clínico y científico. La actividad colagenolítica de algunas MMPs se deriva en parte a su estructura terciaria dependiendo del calcio y el zinc. Son de menor tamaño que el tropocolágeno y poseen tres regiones distintas. Una, llamada propeptídica, tiene la capacidad de unirse a las cadenas de colágeno. Otra, conocida como catalizadora, facilita el despliegue de la triple hélice del colágeno. La tercera región es el extremo carboxilo terminal, y consta de cuatro láminas β que sirven de palas de hélice propulsando a la enzima durante el desmembramiento de las tres cadenas en la hélice alfa. Las cadenas alfa liberadas son susceptibles de ser digeridas por otras enzimas como la pepsina y tripsina.

Con el fin de detectar la actividad de estas enzimas de interés, enzimas con actividad colagenolítica, es fundamental y necesario que el colágeno utilizado como sustrato mantenga su estructura terciaria triple helicoidal durante el procedimiento de inmovilización de las partículas magnéticas sobre sus residuos superficiales, así como durante la fabricación del implante o gel que comprende el compuesto con funcionalidad magnética.

Tanto el condroitín sulfato como el ácido hialurónico son glucosaminoglucanos presentes en el tejido conectivo siendo su catabolismo una señal de regeneración del tejido conectivo. El condroitín sulfato o sulfato de condroitina está compuesto por una cadena de disacáridos de N-acetilgalactosamida y N-ácido glucurónico alternados. Este se encuentra habitualmente asociado a proteínas constituyendo agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos. Una cadena de condroitín puede estar constituida por más de 100 azúcares individuales, cada uno de los cuales puede estar sulfatado en posiciones y en número diverso. El condroitín sulfato aporta al cartílago sus propiedades mecánicas y elásticas, y le proporciona a este tejido mucha de su resistencia a la compresión. Este es digerido por un grupo de enzimas llamadas sulfatasas.

El ácido hialurónico presenta función estructural, como los sulfatos de condroitina. De textura viscosa, existe en la sinovia, humor vítreo y tejido conjuntivo de numerosos organismos y es una importante glucoproteína en la homeostasis articular. En seres humanos destaca su concentración en las articulaciones, los cartílagos y la piel. En un hombre medio de 70 kilogramos de peso puede haber una cantidad total de 15 gramos de ácido hialurónico en su cuerpo, y un tercio de éste se degrada y sintetiza cada día. Está constituido por cadenas de carbohidratos complejos, en concreto unos 50 000 disacáridos de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico por molécula y deriva de la unión de amino azúcares y ácido urónico. Esta cadena se sitúa formando espirales con un peso molecular medio de 2 a 4 millones. Presenta la propiedad de retener grandes cantidades de agua y de adoptar una conformación extendida en disolución, por lo que son útiles a la hora de acojinar o lubricar. Estas propiedades se consiguen gracias al gran número de grupos hidroxilo y de cargas negativas de esta molécula, lo que permite, por el establecimiento de fuerzas de repulsión, que se conserven relativamente separadas entre sí las cadenas de carbohidratos. La hialuronidasa es la enzima que hidroliza el ácido hialurónico en la matriz extracelular

La presente invención también se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular. Preferiblemente, para monitorizar la regeneración de matriz extracelular que forma parte del tejido conectivo, óseo o de un órgano.

En otra realización preferible, el compuesto con funcionalidad magnética se puede utilizar para fabricar un

implante o gel para monitorizar la integración biológica de un implante en un ser humano u otro ser vivo. Si el compuesto con funcionalidad magnética se encuentra en el gel tal como se describe en esta solicitud de patente, éste se puede utilizar para monitorizar la integración biológica de un implante. Por otro lado, si el compuesto con funcionalidad magnética se encuentra en el implante tal como se describe en esta solicitud de patente, éste preferiblemente se puede utilizar para monitorizar la integración biológica de dicho implante.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al implante que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, para monitorizar la de la regeneración de tejido conectivo y/o la integración biológica de un implante. Preferiblemente, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

Así mismo, la presente invención también se refiere al gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, para monitorizar la de la regeneración de tejido conectivo. Preferiblemente, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

La utilización de un implante que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente no solo es útil para la evaluación de la regeneración del tejido conectivo, sino también para el seguimiento de implantes terapéuticos en los cuales se espera la aparición *de novo* de matriz extracelular.

Los implantes objeto de la presente invención adecuados para utilizarse en la monitorización de la regeneración del tejido conectivo pueden ser geles inyectables, parches o apósitos a colocar ya sea en la superficie de tejido a regenerar o como injertos. Existen diversos tipos de implantes de tejido conectivo utilizados clínicamente en forma rutinaria o en proceso de desarrollo. Estos implantes generalmente comprenden una combinación de materiales biocompatibles permanentes y biodegradables. Dichos materiales biodegradables suelen incluir componentes de la matriz extracelular producidos mediante técnicas de cultivo, recombinación genética o extracciones. La degradación, integración y correspondiente sustitución de los componentes del implante por materiales endógenos producidos por el organismo receptor, suele estar relacionada con la invasión de células mesenquimales y fibroblastos.

Tal como se ha mencionado anteriormente, los geles objeto de la presente invención son adecuados para utilizarse en la monitorización de la regeneración del tejido conectivo *in vitro*, y pueden comprender los mismos materiales mencionados en al párrafo anterior para los implantes.

Una forma preferida de preparar el implante o gel es por glicación o entrecruzamiento de elementos de la matriz extracelular. En una realización preferida de la invención se utiliza colágeno del tipo I, tipo II o una combinación de ambos disuelto en ácido acético en una concertación del rango del 1% al 5%, mezclado con ribosa o dextrosa, estabilizado a pH 7,4 e incubado a 4ºC en solución fosfato salina y gelificado a 37ºC. Pudiéndose incorporar suspensiones estabilizadas del compuesto con funcionalidad magnética descrito en esta solicitud de patente durante alguna de las etapas anteriores al gelificado. En una forma aun más preferida de la invención antes de la etapa de gelificado se añade condroitín sulfato o ácido hialurónico, en una concentración del rango del 1% al 5% pudiendo estar el ácido hialurónico, previamente estabilizado por entrecruzamiento.

Así mismo, la presente invención también se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas para fabricar el implante tal como se describe en esta solicitud de patente, para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular en un ser humano u otro ser vivo en un implante. Preferiblemente, para monitorizar la regeneración de tejido conectivo y/o la integración biológica del implante.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato seleccionado del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y una pluralidad de partículas magnéticas, para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular del implante en un ser humano u otro ser vivo. Preferiblemente, para monitorizar la regeneración de tejido conectivo y/o la integración biológica del implante.

La presente invención también se refiere a un método para monitorizar la regeneración de la matriz extracelular,

preferiblemente para monitorizar la regeneración de tejido conectivo, que comprende utilizar un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para monitorizar la regeneración de la matriz extracelular, preferiblemente para monitorizar la regeneración de tejido conectivo, que comprende utilizar un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato seleccionado del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y una pluralidad de partículas superparamagnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente.

La presente invención también se refiere a un método para monitorizar la integración biológica de un implante en un ser humano u otro ser vivo tal como se describe en esta solicitud de patente, que comprende utilizar el compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, caracterizado porque
i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o
ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos.

El compuesto con funcionalidad magnética de la presente invención permite determinar la actividad enzimática de uno o más enzimas ya que dicha actividad provoca una modificación medible en sus propiedades magnéticas, en las propiedades magnéticas de uno o más de sus productos de degradación, o en ambos.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, donde las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas. Preferiblemente, las partículas superparamagnéticas pueden ser nanopartículas de ferritas, como por ejemplo magnetita, maghemita, ferritas de cobalto, plata o magnesio.

En una realización aún más preferible, las partículas superparamagnéticas son nanopartículas de magnetita, siendo especialmente preferible que las nanopartículas de magnetita tengan un diámetro inferior a 15 nm.

El compuesto con funcionalidad magnética que comprende una pluralidad de partículas magnéticas, preferiblemente partículas superparamagnéticas, funcionalizadas con grupos carboxilos y un sustrato de al menos una enzima tal como se describe en esta solicitud de patente, facilita la unión de partículas magnéticas a grupos amino presentes en el sustrato de por lo menos una enzima. Este compuesto con funcionalidad magnética es particularmente de interés cuando el sustrato comprende un número significante de grupos amino, tal como el condroitin sulfato y el ácido hialurónico, dos de los sustratos preferidos de esta invención cuyos monómeros poseen grupos amino.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie.

Los recubrimientos y modificaciones de superficie reducen el efecto de ciertas partículas magnéticas como las partículas de ferrita sobre los tiempos de relajación transversal (T2) y longitudinal (T1), cuya medición es las base de la resonancia magnética utilizada actualmente en aplicaciones médicas. Durante la aglomeración de las partículas, hay dos causas que tienen efecto sobre los tiempos de relajación. Una es el acoplamiento de los momentos magnéticos entre los dominios magnéticos de las distintas partículas y la otra es la irrigación de los espacios entre partículas magnéticas por moléculas de agua. Esta irrigación de un agregado de partículas magnéticas depende obviamente de la hidratación del mismo y está gobernada por la difusión y captura de moléculas de agua en las proximidades de las mismas partículas magnéticas. Ambos fenómenos tienen efecto sobre T2, pero solo el acoplamiento entre dominios tiene efecto sobre T1. La existencia de modificaciones de superficie tiende a acortar T1 a través de los mismos mecanismos de captura y difusión de moléculas de agua en el interior del agregado que a su vez apantallan los efectos de acortamiento de T1 que son producto de la propia agregación. Durante el desarrollo de la invención, se ha llegado a observar que las diferencias en T2 observadas en colágeno modificado para tener funcionalidad magnética antes y después de tratamiento con colagenasas *in vitro* pueden ser hasta un 30% mayores cuando se utilizan partículas sin modificaciones de superficie comparadas con partículas funcionalizadas con coberturas de superficie. En ambos casos se utilizaron partículas

de magnetita de 10nm. Una descripción más detalladas de los efectos en las propiedades de las partículas magnéticas aisladas a consecuencia de modificaciones de superficie y la agregación de las mismas está dada respectivamente en Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity, LaConte LE, Nitin N, Zurkiya O, Caruntu D, O'Connor CJ, Hu X, Bao G.; J Magn Reson Imaging. 2007 Dec;26(6):1634-41 y Water magnetic relaxation in superparamagnetic colloid suspensions: The effect of agglomeration, A. Roch, F. Monky, R.N. Muller, P. Gillis; Magnetic Resonance in Colloids an Interface Science, J. Fraissard, O. Lapina, p. 383- 92. El hecho de que las partículas magnéticas contenidas en el compuesto con funcionalidad magnética descrito en esta solicitud de patente no presenten ningún recubrimiento o modificación de superficie, permite obtener una mayor diferencia en los tiempos de relajación medidos antes de la digestión compuesto con funcionalidad magnética y tras la agregación de las partículas magnéticas como consecuencia de la digestión enzimática.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glicoaminglicano y una combinación de éstos. Preferiblemente, el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, preferiblemente partículas superparamagnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, y donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

En una realización especialmente preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de nanopartículas de magnetita que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, y donde el sustrato se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto con funcionalidad magnética que comprende una pluralidad de partículas magnéticas inmovilizadas en un sustrato de al menos una enzima, donde las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, y dicho compuesto se obtiene por el procedimiento descrito a continuación en esta solicitud de patente.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie tal como se describe en esta solicitud de patente, caracterizado dicho procedimiento porque comprende:
a) modificar el sustrato de al menos una enzima, e
b) inmovilizar una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie en el compuesto modificado obtenido en la etapa a).

En la etapa a) de modificación del sustrato se utilizan sustancias que posteriormente se puedan unir a la superficie de las partículas magnéticas. Esta reacción de unión suele estar facilitada por la disociación iónica del agua en la superficie de dichas partículas, siendo las sustancias utilizadas para la modificación del sustrato altamente reactivas en medio acuoso. Por lo tanto, la modificación del sustrato se realiza preferiblemente en condiciones anhidras y medio orgánico, lo que permite minimizar o evitar la reacción de la sustancia utilizada para modificar el sustrato con el agua.

A diferencia de otros procedimientos conocidos en el estado de la técnica en los que las partículas magnéticas están recubiertas o presentan alguna modificación de superficie, este procedimiento permite unir el sustrato de la enzima a partículas magnéticas que son casi en su totalidad núcleo magnético en sí, obteniendo así un compuesto con funcionalidad magnética mucho más sensible a la hora de determinar la actividad enzimática.

Preferiblemente, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética que comprende inmovilizar una pluralidad de partículas magnéticas sin recubrimiento o modificación de superficie, más preferiblemente partículas superparamagnéticas, en un sustrato de al menos una enzima tal como se describe en esta solicitud de patente, donde en la etapa a) el sustrato reacciona preferentemente con

un compuesto seleccionado del grupo que consiste en aminosilanos, sales de diazonio aromáticas, polímeros, polielectrólitos y complejos bidentados, preferentemente en un medio orgánico.

La etapa a) del procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente puede realizarse utilizando un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliaminas, polietilenos, polidimidas y poliestirenos. También puede utilizarse en esta etapa 1) de modificación del sustrato un complejo bidentado seleccionado del grupo que consiste en profirinas y pirimidinas. Adicionalmente, también puede utilizarse en esta etapa del procedimiento dopamina conjugada con ácido succínico en un medio acuoso.

En una realización aun más preferida de la invención la etapa a) del procedimiento se puede realizar con aminosilanos en un medio orgánico con un contenido de agua máximo de 2%, preferentemente máximo de 1%, lo que permite evitar o reducir al mínimo el contacto del aminosilano con el agua, evitando así reacciones de silanización o entrecruzamiento entre moléculas de aminosilano.

Los aminosilanos pertenecen al grupo de los alcoxisilanos. Compuestos como la mica, el vidrio o los óxidos de superficie pueden ser silanizados al contener grupos hidroxilos reemplazables por los grupos alcoxi de los silanos dando lugar a la formación de enlaces covalentes -Si-O-Si. La utilización de aminosilanos permite la unión de elementos orgánicos con inorgánicos. Los alcoxisilanos se dividen en tres grupos: los aminosilanos, los cuales poseen un grupo amino secundario o terciario, los glicidoxisilanos con un epóxido, y el tercer grupo está dado por los mercaptosilanos, los cuales poseen tioles.

En una realización aún más preferida, el aminosilano utilizado en la etapa a) del procedimiento de obtención del compuesto con funcionalización magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede seleccionar del grupo que consiste en (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES), (3-aminopropil)-dietoxi-metilsilano (APDEMS), (3-aminopropil)-dimetil-etoxisilano (APDMES) y (3-aminopropil)-trimetoxisilano (APTMS).

En una realización especialmente preferida, el aminosilano utilizado en la etapa a) del procedimiento de la presente invención es (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) en medio orgánico.

La etapa a) de reacción del aminosilano, preferiblemente APTES, con el sustrato tiene lugar en disolvente orgánico anhidro en condiciones adecuadas para mantener la integridad estructural del sustrato y facilitar la dispersión del mismo, preferiblemente una proteína. Dichas condiciones pueden variar según la estructura del sustrato y suelen ser función de la polaridad y proticidad del solvente. Para el colágeno se prefiere que el solvente sea polar para preservar los enlaces entre prolinas e hidroxiprolinas. En una realización preferida de la invención el solvente utilizado en esta etapa es el acetonitrilo. En ciertas realizaciones de la invención es posible que la integridad estructural del sustrato solo pueda ser determinada por técnicas experimentales como la espectrografía, cromatografía o el dicroísmo circular.

El compuesto funcionalizado obtenido en la etapa a) del procedimiento de la invención puede inmovilizar partículas de óxido de hierro u otras ferritas sin recubrimientos o modificaciones de superficie, suspendidas en medio orgánico con una cierta cantidad de agua disuelta que facilite la aparición de iones -OH sobre la superficie de dichas partículas.

En otra realización aún más preferida, el procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética de la presente invención comprende una etapa adicional, previa a la etapa a), de activación del grupo amino del aminosilano, preferiblemente siendo el aminosilano APTES, con un anhídrido de ácido y una base orgánica en un medio orgánico con un contenido de agua máximo del 2%, preferentemente máximo del 1%. Así, el grupo amino activado del aminosilano puede reaccionar en la etapa a) del procedimiento de la invención con grupos carboxílicos presentes en el sustrato.

Preferiblemente, la activación del grupo amino del aminosilano puede tener lugar en presencia de anhídrido glutárico y *N,N*-diisopropiletilamina, en un medio orgánico como puede ser cloroformo, acetonitrilo, pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, benceno, tuoleno, 1,4- dioxano, eter dietílico, diclorometano, tetrahidrofurano, acetato etílico, acetona. dimetilformamida o dimetil sulfóxido.

En otra realización aún más preferida, el procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética de la presente invención comprende una etapa adicional, previa a la etapa a), de activación del grupo amino del aminosilano, preferiblemente siendo el aminosilano APTES, con un aldehído en un medio orgánico con un contenido de agua máximo de 2%, preferentemente máximo de 1%. De esta forma también se consigue la activación del grupo amino del aminosilano, facilitando su reacción en la etapa a) del procedimiento de la invención con grupos carboxílicos presentes en el sustrato.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética que comprende una pluralidad de partículas magnéticas, preferiblemente partículas superparamagnéticas, funcionalizadas con grupos carboxilos y un sustrato de al menos una enzima tal como se describe en esta solicitud de patente, donde dicho procedimiento comprende la reacción de las partículas magnéticas funcionalizadas con grupos carboxílicos con el sustrato mediante aldehídos y/o carbodiimidas. De manera similar, se pueden modificar grupos amino del sustrato, preferiblemente una proteína, para inmovilizarlas en dichas partículas funcionalizadas con grupos carboxilos en su superficie como, por ejemplo, utilizando ácido dimercaptosuccínico.

Algunos métodos para modificar partículas magnéticas con grupos carboxilo se describen en Preparation and characterization of carboxyl functionalization of magnetite nanoparticles for oligonucleotide immobilization, Min-Jung Kim, Dae-Hwan Jang, Yong-Ho Choa; Physica Scripta T, 2010, volumen 139 página 14024. La unión entre aminosilano y partículas magnéticas, preferiblemente nanopartículas de magnetita, se produce a través la interacción entre los alcoxi y los grupos hidroxilo en la superficie de óxido de hierro.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un producto que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, donde dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un implante, un gel, una composición farmacéutica y un agente de contraste.

En una realización preferida, el producto que comprende el compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente puede ser una composición farmacéutica y comprender además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una vía de administración preferida del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, sin excluir otras formas de administración posibles, es la administración intravenosa, preferiblemente local. Una lista detallada de las posibles formas de administración de las posibles formulaciones derivadas de esta invención está dada por John M. Walker, Macromolecular drug delivery: methods and protocols, Volume 480, Methods in molecular biology, Springer protocols.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica encapsulada que comprende el compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, adecuado este excipiente para permitir la liberación del compuesto con funcionalidad magnética en el sitio donde tiene lugar la reacción entre el sustrato modificado y al menos una de las enzimas con las que reacciona.

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere a una composición encapsulada que comprende un principio activo, el compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. De esta forma, esta composición encapsulada se puede utilizar para evaluar la eficacia de administración de dicho principio activo.

De forma especialmente preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede comprender un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez una pluralidad de nanopartículas de magnetita, preferiblemente sin recubrimientos o modificación de superficie, inmovilizadas en un sustrato seleccionado del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un implante o un gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente.

Preferiblemente, el implante o gel comprende el compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato implicado en la regeneración de la matriz extracelular tal como se ha descrito anteriormente en esta solicitud de patente, y una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie tal como se describe en esta solicitud de patente.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al implante o gel que comprende el compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato seleccionado del grupo que

consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico, y una pluralidad de partículas magnéticas, preferiblemente nanopartículas de magnetita, que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie tal como se describe en esta solicitud de patente.

En otra realización aún más preferida, el implante o gel comprende el compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato implicado en la regeneración de la matriz extracelular tal como se ha descrito anteriormente en esta solicitud de patente, y una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, y dicho compuesto con funcionalidad magnética se obtiene por el procedimiento descrito en esta solicitud de patente.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un producto tal como se describe en esta solicitud de patente para determinar o discriminar la actividad enzimática de una o más enzimas.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un producto tal como se describe en esta solicitud de patente para detectar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad enzimática de al menos una enzima.

Preferiblemente, la enfermedad o trastorno se puede seleccionar del grupo que consiste en reumatitis, artritis, lesión, enfermedad relacionada con el tejido conectivo, enfermedad de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, enfermedad relacionada con el colágeno, esteatosis, fibrosis, cirrosis, metástasis, regeneración de tejidos, cáncer, enfermedad coronaria, enfermedad del hígado, enfermedad metabólica, infección y enfermedad inflamatoria.

La actividad de las MMPs cumple una parte en enfermedades como la artritis, reumatitis, condiciones relacionadas con el crecimiento del tejido conectivo así como las enfermedades de Dupuytren o de Peyronie, las condiciones que conducen a la fibrosis hepática, cirrosis o cardiovasculares, las obstrucciones de la angina del tipo inestable. Una descripción más completa de la función de la actividad enzimática de estas enfermedades está dada por Woessner JF Jr., in Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, FASEB J. 1991 May; 5(8):2145-54 and by Somers KD, Dawson DM in Fibrin deposition in Peyronie's disease plaque J Urol. 1997 Jan; 157(1):311-5.

Así mismo, la presente invención también se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar la composición farmacéutica descrita anteriormente para detectar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad enzimática de al menos una enzima. Preferiblemente, cuando la enfermedad o trastorno se selecciona del listado incluido anteriormente.

El seguimiento de la actividad de las MMPs merece especial consideración en el catabolismo de la matriz extracelular, el cual se relaciona con la enfermedad coronaria inestable.

La matriz extracelular y una capa fibrosa gruesa proporcionan estabilidad a la placa aterosclerótica. Por lo general, la placa inestable tiene una fina capa fibrosa, un elevado número de células inflamatorias, un núcleo lipídico grande y puede inducir la formación de trombos. La síntesis de colágeno por las células del músculo liso es estimulada por factores de crecimiento, como factor de crecimiento transformante-beta (TGF-ß). La inflamación en las placas, con la acumulación de macrófagos y linfocitos T, conduce a la liberación de MMPs, que digieren el colágeno y causan el adelgazamiento de la capa fibrosa. El núcleo lipídico necrótico crece como resultado de la acumulación de lípidos en la matriz extracelular, la muerte de los macrófagos cargados de lípidos, y posiblemente por la acumulación de las membranas de eritrocitos después de la hemorragia intraplaca de los vasa vasorum.

Radicales de oxígeno se generan a partir de diversas fuentes, incluyendo la NADPH oxidasa y las células inflamatorias, oxidan las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y causan la necrosis de las células. Ciclos repetitivos de rotura y curación de la placa, que puede ser clínicamente silenciosa, producen capas en la placa. A diferencia de las enzimas proteolíticas intracelulares que se encuentran en orgánulos llamados lisosomas, las MMPs actúan en el espacio extracelular y a pH fisiológico. La superfamilia de las metaloproteasas de la matriz

incluye la MMP 1 o colagenasa intersticial, una enzima especializada en la división inicial de los colágenos fibrilares generalmente resistente a la proteasa que confieren resistencia a la capa fibrosa del ateroma. Otros miembros de la familia de metaloproteasas de matriz, como las gelatinasas, pueden catalizar la subdivisión de los fragmentos de colágeno. Las estromelisinas pueden activar otros miembros de la familia de las MMPS y pueden degradar una amplia gama de componentes de la matriz, incluyendo las redes troncales de proteínas de las moléculas de proteoglicanos. Las estromelisinas y una de los gelatinasas (gelatinasa B o gelatinasa de 92 kDa), también pueden romper la elastina, un componente adicional estructuralmente importante de la matriz extracelular vascular.

La evidencia clínica apoyada con modelos moleculares muestra que el riesgo de eventos significativos en la enfermedad coronaria, tales como obstrucciones, accidente cerebrovascular o infarto agudo de miocardio, son causados por la rotura de la placa debido a las MMPs inducidas por la anteriormente descrita excreción inmunológica de colesterol LDL, pero no por el tamaño de las obstrucciones.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un agente de contraste para determinar la actividad enzimática de las MMP en la placa coronaria. Preferiblemente, el sustrato puede ser una proteína y ésta se puede seleccionar del grupo que consiste en colágeno, fibrilina y elastina.

Las MMP también están muy relacionadas con ciertas enfermedades hepáticas. La fibrosis hepática involucra múltiples eventos celulares y moleculares que conducen a la deposición de un exceso de proteínas de matriz extracelular y hasta una distorsión de la arquitectura normal del hígado. Las etiologías incluyen la hepatitis viral crónica, el hígado graso por abuso de alcohol, esteatosis no alcohólica y toxicidad por medicamentos. La sobreexpresión de MMP es uno de los marcadores moleculares que pueden diferenciar la esteatosis hepática de la fibrosis o cirrosis. Además, un tipo de colagenasa (MMP-13) y otras MMPs tienen una actividad transitoriamente aumentada en la primera etapa de la fibrosis hepática y una actividad reducida en la fibrosis avanzada.

Una disposición progresiva neta de colágeno tipo I y III se ha observado durante el desarrollo de la fibrosis. Aparte de las MMP-1, MMP-8 y MMP-13, las MMPs en general no pueden romper el colágeno tipo I. Las MMP-2, MMP-3 y MMP-9 pueden digerir al colágeno tipo IV y la actividad enzimática de estas MMPs disminuye progresivamente con la aparición de la cirrosis. Los estudios moleculares de la expresión de ARNm de estas enzimas (incluyendo aquellas con actividad colagenolítica) han demostrado que se expresan en el hígado, incluso en la cirrosis, pero su actividad se mantiene en gran medida bajo control por sus inhibidores, los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP) 1 y 2. El potencial de degradación de la matriz está presente, incluso en la cirrosis avanzada, pero es contenida por la secreción de los TIMP.

Se cree que la regresión de la fibrosis hepática está mediada por la disminución en la expresión de TIMP e implica la degradación del colágeno fibrilar por una combinación de MMP- 1 y gelatinasa A, además de la colagenasa intersticial. Las células de Kupffer y los lipocitos desempeñan un papel central en la síntesis de MMP y TIMP. Nano- y micro-partículas suelen ser marcadamente retenidas por las células de Kupffer en el hígado.

La administración de colágeno modificado para tener funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente es útil para evaluar diversas condiciones hepáticas mediante la determinación de la actividad colagenolítica de ciertas MMPs en el hígado. Este colágeno modificado produce un efecto de contraste causado por los tiempos de relajación diferentes para los protones del agua que están en las proximidades de las partículas magnéticas ancladas al colágeno modificado respecto a sus contrapartes lejanas. Este efecto en la relajación es aún mayor si las partículas magnéticas se agregan como consecuencia de la degradación enzimática. Dicha diferencia es aún más significativa si las partículas magnéticas no llevan modificaciones de superficie.

Así, el grado de dicho efecto un mayor contraste en la imagen de resonancia magnética es una señal de expresión de las MMPs. Este aumento en el efecto de contraste de la señal de la resonancia magnética se puede medir en el tiempo por diferentes parámetros utilizados en las mediciones de imagen de resonancia magnética como la intensidad de la señal, imágenes ponderadas de T1 o T2, el cálculo de los parámetros de difusión, imágenes de saturación o una combinación de ellos, sin excluir otros parámetros de RMN no enumerados en esta solicitud. Una breve descripción de algunos de estos parámetros se proporciona de la siguiente manera. Una descripción más completa de los parámetros de la RM y sus principios es proporcionada por Mitchell et al en el libro” MRI Principles”.

Cuando colágeno modificado para tener funcionalidad magnética mediante la inmovilización de partículas magnéticas, como se describe anteriormente se administra al hígado, en comparación con el hígado normal, en las etapas finales de la esteatosis o hepatosteatosis y principios de la fibrosis se puede observar mediante técnicas analíticas como la resonancia magnética un efecto de contraste mayor, pero durante las etapas posteriores de la fibrosis o cirrosis este efecto de contraste es más moderado.

La expresión de las MMPs es también significativamente mayor en los pacientes con metástasis hepáticas. En el cáncer, el equilibrio entre la producción y la activación de las MMPs y su inhibición por las TIMPs es un aspecto crucial de la invasión y la metástasis. Las MMPs se sintetizan en los tejidos y se filtran por el torrente sanguíneo. Se ha observado que en los cánceres, colorrectal, de mama, de próstata y de vejiga, la mayoría de los pacientes con enfermedad severa han incrementado los niveles plasmáticos de gelatinasa B.

En especial, en pacientes con cáncer colorrectal avanzado, se ha observado una correlación entre altos niveles de ya sea gelatinasa B o complejo TIMP y se asociaron con una supervivencia más corta. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención el utilizar compuestos con funcionalidad magnética como sustratos para evaluar la expresión y/ o actividad enzimática y sus consecuencias en cáncer y, en general, la actividad de MMP y otras enzimas en órganos, tejidos u otros compartimentos corporales.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular, preferiblemente en la regeneración de cartílago .

En otra realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente, para fabricar un implante para monitorizar la integración biológica del implante en un ser humano u otro ser vivo.

Preferiblemente, el compuesto con funcionalidad magnética descrito en esta solicitud de patente que comprende nanopartículas de magnetita funcionalizadas con grupos carboxílicos e inmovilizadas en condroitín sulfato, se añade a una mezcla acuosa que comprende una cantidad adicional de condroitín sulfato, o de otro glicosoaminglicaco o glicoproteína adecuado para fabricar un implante de cartílago. De esta forma se obtiene un gel que puede incorporarse a un implante de cartílago y actuar como reportero de la actividad de hidrolasas de condroítin sulfato o sulfatasa, las cuales cumplen un rol en la regeneración del cartílago. Adicionalmente, este gel también se puede utilizar como reportero de la actividad de hidrolasas de condroítin sulfato o sulfatasa in vitro.

En forma similar y alternativa al condroitín sulfato en otra realización de la invención se puede emplear ácido hialurónico.

Al administrar a un ser vivo, preferiblemente a un ser humano, el compuesto con funcionalidad magnética que comprende una pluralidad de partículas magnéticas inmovilizadas en un sustrato de al menos una enzima tal como se describe en esta solicitud de patente, dicho compuesto permite determinar la actividad enzimática de una o más enzimas que reaccionen con dicho sustrato. Esta determinación se realiza midiendo la variación que provoca dicha reacción enzimática en un parámetro asociado a las propiedades magnéticas del compuesto con funcionalidad magnética, de al menos uno de sus productos de reacción, o de una combinación de ambos.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del:
-compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en el procedimiento de regeneración celular y una pluralidad de partículas magnéticas para fabricar un implante o gel tal como se ha descrito en esta solicitud de patente; o
- compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, donde i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos tal como se describe en esta solicitud de patente;
donde la reacción enzimática provoca un cambio al menos parcial de superparamagnetismo a paramagnetismo.

Existen varias técnicas analíticas que se pueden utilizar para determinar los efectos de la actividad enzimática

utilizando el compuesto con funcionalidad magnética descrito en esta solicitud de patente. Así, en otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, para determinar la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia paramagnética electrónica (EPR, según sus siglas en inglés), magnetometría incluyendo magnetometría vibracional (MVS, según sus siglas en inglés) y magnetometría de equipo de interferencia superconductiva cuántica (SQUID, según sus siglas en inglés), espectrometría Mössbauer, dicroísmo circular magnético de rayos X (XMCD, según sus siglas en inglés), resonancia ferromagnética (FMR, según sus siglas en inglés), efecto Kerr magneto óptico (MOKE, según sus siglas en inglés), dispersión de luz de Brillouin (BLS, según sus siglas en inglés), inductancia electromagnética, microscopía de fuerza atómica, magnetorelaxometría y una combinación de ellas.

Algunas de estas técnicas se pueden utilizar para determinar in vitro o ex vivo la existencia de actividad enzimática mediante el establecimiento de espectros y curvas de muestras previamente disecadas o liofilizadas que contengan sustratos modificados para tener funcionalidad magnética y observándose cambios en dichos espectros o curvas en función del estado de agregación de las partículas magnéticas presentes en sustratos modificados para tener funcionalidad magnética antes y después de su exposición a un agente biológico. A continuación se hace una breve descripción de las mismas.

La espectroscopía EPR mide las diferencias de energía entre los estados originados por el desdoblamiento que se genera al poner un sistema con electrones desaparejados en un campo magnético externo (efecto Zeeman). La diferencia de energías entre dos estados será de la forma gμBHZ, donde g es el factor de Landé, μB es el magnetón de Bohr y H el campo magnético aplicado. La denominada condición de resonancia para obtener en el espectro un pico de resonancia es:

$$h\nu = g_j \mu_B H_Z$$

y este campo $H_Z$ será el campo de resonancia. De aquí puede despejarse el factor de Lande g. Este factor g puede llegar a ser muy útil a la hora de identificar la muestra, pero no es único, va a depender de la frecuencia elegida para la radiación. Otros datos arrojados por el espectro como intensidades, número de líneas, distancia entre ellas, su forma y ancho entre otros también constituyen otras fuentes de información muy útiles a la hora de identificar y caracterizar la muestra. De este modo, los electrones de las partículas magnéticas, especialmente los que se encuentra más cercanos a las superficies de las mismas, producirán señales de resonancia distintas en función del estado de agregación de las partículas magnéticas las cuales se traducen en cambios en el espectro.

La MVS y SQUID miden directamente los campos magnéticos en función de la magnetización de una muestra y determinan curvas de variación de los mismos.

La espectroscopia Mössbauer es una técnica espectroscópica basada en la emisión y la absorción resonante de rayos gama en sólidos. Esta es similar a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) en que sondea transiciones nucleares y así es sensible a las similares interacciones electrón-núcleo como causa el desplazamiento químico RMN. El elemento emisor para caracterizar composiciones con $Fe^{57}$ suele ser el $Co^{57}$. Típicamente, hay tres tipos de interacciones nucleares que son observadas, desplazamiento isomérico, división del cuadrupolo, y división hiperfina. La división hiperfina (también división Zeeman) es un resultado de la interacción entre el núcleo y cualquier campo magnético circundante. Típicamente, esto divide el pico sencillo en seis picos no degenerados. La división hiperfina usualmente medida como la distancia entre la parte más externa de estos seis picos. La división hiperfina es especialmente importante en la espectroscopia Mössbauer de los compuestos que contienen hierro, que con frecuencia son ferromagnéticos o antiferromagnéticos, resultando en fuertes campos magnéticos internos. Además de la identificación, las intensidades relativas de los varios picos reflejan las concentraciones relativas de los compuestos en la muestra y pueden ser usadas para el análisis semicuantitativo. También, puesto que los fenómenos ferromagnéticos son dependientes del tamaño, los espectros pueden proporcionar información del tamaño de las estructuras cristalina y granular de un material que contenga hierro.

El dicroísmo circular magnético de rayos X (XMCD) es la diferencia entre dos espectros de absorción de rayos X, tomados aplicando un campo magnético, uno con luz polarizada circularmente a derechas (RCP) y otra a izquierdas (LCP). La mayor ventaja de esta técnica es su sensibilidad a cada elemento, lo que permite caracterizar magnéticamente elementos específicos y hallar momentos magnéticos de elementos minoritarios o diluidos en una matriz. Como la medida de absorción de rayos X se lleva a cabo para energías correspondientes al borde de absorción de un elemento específico, solo se observa la contribución particular de dicho elemento. Esta característica es particularmente interesante al tratar con nanopartículas, ya que permite separar la contribución de otros elementos o de posibles impurezas a la imanación total. El efecto se basa en que la

absorción de los rayos X por el material va a ser dependiente de la polarización de la luz y de los momentos de espín y orbital de los electrones. Midiendo la absorción de la muestra para ambas polarizaciones circulares (izquierda o derecha) y restando ambos espectros se obtiene la señal XMCD. Es entonces posible calcular el momento magnético de un electrón por medio de las llamadas reglas de suma. Esta técnica permite además separar las componentes de espín y orbital al momento magnético.

En la técnica de resonancia ferromagnética (FMR) un campo magnético es aplicado paralelo al plano de una película que contiene a la muestra. La muestra es colocada en un goniómetro que permite girar el plano de la misma con respecto a la dirección del campo. Se obtiene el campo de resonancia, HR, y ancho de línea pico a pico, $\Delta H$ como funciones del ángulo del campo en el plano, de la temperatura y del espesor de la película.

Cuando un rayo de luz polarizada se refleja en la superficie de un material magnetizado, el plano de polarización puede rotar ligeramente. Este efecto es conocido como efecto Kerr magneto- óptico o MOKE el cual es ampliamente utilizado en la caracterización de películas delgadas de materiales ferromagnéticos. En forma similar a la FMR la muestra es colocada es un goniómetro que permite girar el plano de la misma con respecto a la dirección del campo, pero a diferencia de esta, se obtiene una estimación del área de una curva de histéresis a partir de la medición de los coeficientes de refracción para los distintos ángulos de orientación de la muestra.

La dispersión de Brillouin es un fenómeno óptico que se puede observar cuando existen irregularidades magnéticas en una película o medio que es atravesado por un haz incidente.

En otra realización preferida de la invención, estas técnicas analíticas permiten la detección de la actividad enzimática *in vivo* y se pueden seleccionar del grupo que consiste en la magnetometría y la resonancia magnética nuclear. En una realización aún más preferida de la invención esta técnica analítica es la resonancia magnética de imagen.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la reacción enzimática provoca una variación en las propiedades magnéticas, preferentemente un cambio al menos parcial de superparamagnetismo a paramagnetismo, detectable mediante la determinación de un parámetro seleccionado del grupo que consiste en intensidad de señal, tiempo de relajación longitudinal (T1), tiempo de relajación transversal (T2), parámetro de difusión, señal de respuesta a unas primera serie de pulsos, señal de saturación I y una combinación de ellos. Preferiblemente, la variación en las propiedades magnéticas provocada por la reacción enzimática se puede determinar mediante un parámetro seleccionado del grupo que consiste en tiempo de relajación longitudinal (T1), tiempo de relajación transversal (T2) y el ratio entre T1 y T2. Preferiblemente, dicha variación se puede determinar mediante el radio entre T1 y T2.

Preferiblemente, la variación en las propiedades magnéticas provocada por la reacción enzimática se puede determinar analizando dicho parámetro antes y después de que tenga lugar la reacción enzimática tal como se ha descrito en esta solicitud de patente. En particular, el parámetro se analiza antes y después de que tenga lugar la reacción enzimática entre el compuesto con propiedades magnéticas objeto de la invención que comprende un sustrato de una o más enzimas, y una o más de estas enzimas.

Los métodos de medición basados en la resonancia magnética, como por ejemplo la resonancia magnética nuclear o la resonancia paramagnética electrónica (EPR), son métodos indirectos adecuados para medir las variaciones en las propiedades magnéticas de los compuestos con funcionalidad magnética, de al menos uno de sus productos de degradación o de una combinación de estos. En el caso de los métodos de resonancia nuclear se miden los tiempos de relajación de la respuesta al efecto de la aplicación de una radiofrecuencia (RF) perpendicular a un campo magnético intenso. Estos tiempos de relajación son llamados T1 y T2, y representan los tiempos característicos de la relajación de los protones del agua como consecuencia de la desaparición de un campo magnético en el plano longitudinal a la RF aplicada y la reaparición de la fuerza del campo magnético en la perpendicular al plano de la RF aplicada, respectivamente, como consecuencia de la eliminación de tales RF. En comparación con los materiales diamagnéticos como la mayoría de los tejidos y fluidos biológicos, T1 y T2 son significativamente más cortos en la presencia de materiales ferromagnéticos, paramagnéticos y superparamagnéticos. Desde hace tiempo también se conoce que la adición de solutos paramagnéticos provoca una disminución en la medida de parámetros T1 de protones de hidrógeno del agua.

La resonancia magnética, tal y como se utiliza en aplicaciones clínicas, se basa en el balance entre el momento magnético extremadamente pequeño en un protón, y el altísimo número de protones presentes en el tejido biológico, lo que conduce a un efecto medible en presencia de grandes campos magnéticos. Para $B_0$ paralelo al eje z estas señales de relajación son de la forma:

$$m_z = m\left(1 - e^{-t/T_1}\right)$$

y

$$m_{x,y} = m\sin\left(\omega_0 t + \varphi\right)e^{-t/T_2}$$

Donde $m_z$ es la magnetización a lo largo del eje z, $m_{xy}$ la magnetización perpendicular al eje z T1 T2 son los tiempos de relajación longitudinal y transversal respectivamente, $\omega_0$ es la frecuencia de precesión y φ es una constante de fase. La relajación longitudinal refleja una pérdida de energía, como calor, desde el sistema a su red circundante, y es sobre todo una medida del acople bipolar de los momentos de protones a su entorno. La relajación en el plano xy es relativamente rápida, y es impulsada por la pérdida de coherencia de fase en la precesión de protones debido a sus interacciones magnéticas entre sí y con otras fluctuaciones de los momentos magnéticos en el tejido. Un desfase también puede verse afectado por inhomogeneidades locales en el ámbito de aplicación longitudinal, dando lugar a la sustitución de T2 en la ecuación de segundo el tiempo de relajación más cortos, T2*:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma\frac{\Delta B_0}{2}$$

Donde $\Delta B_0$ es la variación en el campo producido ya sea a través de las distorsiones en la homogeneidad del campo aplicado en sí, o por variaciones locales en la susceptibilidad magnética del sistema. Esta variación de $\Delta B_0$ puede ser precisamente provocada por partículas magnéticas, las cuales causan un predominio significativo sobre los posibles factores locales de inhomogeneidad del campo $B_0$. Para algunas realizaciones de la invención dichas diferencias resultantes en $\Delta B_0$ provocadas por los cambios en el estado de distribución o agregación de partículas magnéticas las cuales son primero inmovilizadas sobre sustratos u otras macromoléculas de interés la causa de la señal detectada como consecuencia de la degradación o la utilización metabólica de dichos sustratos u otras macromoléculas de interés.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la variación en una propiedad magnética es indicativa de por lo menos un fenómeno físico seleccionado del grupo que consiste en:
- agregación de las partículas magnéticas,
- agregación del compuesto con funcionalidad magnética o al menos uno de los productos de reacción de este,
- cambio en el tamaño de las partículas magnéticas, y
- cambio en el tamaño de partícula de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en el compuesto con funcionalidad magnética objeto de la presente invención, al menos uno de los productos de reacción de éste y una recombinación de los mismos.

Es de señalar que el efecto de la alineación de los momentos magnéticos de partículas magnéticas puede variar notablemente como consecuencia de su agrupación o distribución. Se puede entender a partir de dos factores 1) los efectos de la agitación térmica o cinética, como se explicó anteriormente, y 2) el promedio de tiempo y energía necesaria para responder a un campo magnético externo aplicado como se explica a continuación.

Un caso de especial interés es aquel en el que las partículas magnéticas son superparamagnéticas y tienden a agregarse como consecuencia de la variación de tales conformaciones. A continuación, el agregado magnético resultante, que no ha de ser necesariamente superparamagnético, posee propiedades magnéticas que difieren en forma medible de las propiedades magnéticas de las partículas magnéticas originales. Por lo tanto, al determinar variaciones en las propiedades magnéticas, puede detectarse una señal de un efecto enzimático. En el caso de nanopartículas de magnetita de menos de 15 nm de diámetro, las mismas se comportan como superparamagnéticas cuando están suspendidas en soluciones acuosas a temperaturas biológicas, pero su comportamiento se convierte en paramagnético si se agregan formando cúmulos de mayor diámetro.

La Figura 1 muestra el efecto del tamaño y la agregación de las nanopartículas superparamagnéticas y paramagnéticas de magnetita en la medición de la inversa de T2 también llamado relatividad magnética R2. Se puede observar que las nanopartículas superparamagnéticas una vez agregadas se comportan en forma más parecida a la de las partículas paramagnéticas.

Si un material magnético se coloca en un campo magnético de intensidad H, los momentos atómicos individuales en el material contribuyen en respuesta alineándose en el sentido de este. Es lo que se llama inducción magnética:

$$B = \mu_0 (H + M)$$

Donde $\mu_0$ es la permeabilidad magnética del medio, y la magnetización M = m / V es el momento magnético por unidad de volumen, siendo m es el momento magnético en un material con volumen V. Todos los materiales poseen una respuesta magnética en función de su estructura atómica y temperatura. Pueden ser clasificados convenientemente en términos de su susceptibilidad magnética volumétrica, $\chi$, donde $M = \chi H$ describe la magnetización inducida en un material por H. En las unidades del SI $\chi$ es adimensional y M y H se expresan en $Am^{-1}$.

La susceptibilidad de los materiales no sólo depende de la temperatura, sino también de la intensidad del campo magnético (H), que da lugar a la característica forma sigmoidal de la curva M-H, con M acercándose a un valor de saturación a valores grandes de H. Por otra parte, en los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos a menudo aparece una curva de histéresis que es una irreversibilidad en el proceso de magnetización relacionada con el espín de los dominios magnéticos en las paredes de las impurezas o límites de granulación dentro del material mismo, así como a efectos intrínsecos tales como la anisotropía magnética de la red cristalina. Esto da lugar que las curvas M-H generen bucles de histéresis. La forma de estos ciclos están determinados en parte por el tamaño de las partículas: en las partículas grandes (del orden de micras o más) es un estado fundamental de varios dominios lo que conduce a un ciclo de histéresis estrecho, ya que requiere relativamente poca energía del campo hacer que las paredes de los dominios se muevan. En partículas más pequeñas el estado basal del dominio único es lo que determina la existencia dede histéresis En tamaños aún más pequeños (del orden de decenas de nanómetros o menos) se observa superparamagnetismo, donde el momento magnético de la partícula es libre de fluctuar en respuesta a la energía térmica, mientras que los momentos atómicos individuales relativos mantienen su estado ordenado. Esto origina curvas M-H sigmoidales, carentes de histéresis. Incluso para partículas superparamagnéticas dispuestas a granel, sus momentos magnéticos interactúan afectando a las curvas M-H (incluso en algunos casos se puede observar histéresis) como también a los tiempos de relajación dando lugar a otros efectos magnéticos y ópticos.

Este efecto se puede apreciar por ejemplo mediante espectrometría vibracional magnética (MVS). La figura 2 representa la curva M-H de colágeno tipo I funcionalizado con nanopartículas superparamagnéticas de magnetita con un diámetro de 10 nm en 10 ml suspensión salina inmovilizadas en agarosa.

La figura 3 representa la curva H-M de una suspensión similar inmovilizada en agarosa después de la incubación con colagenasa tipo I durante 12 horas a 37 º C. En la figura. 3, se puede apreciar una curva un poco abierta, sin embargo, la curva de H-M de la figura. 2 no muestra histéresis. Este comportamiento magnético se debe a la interacción entre los momentos magnéticos de las nanopartículas en su conjunto después de la agregación de las mismas como consecuencia de la actividad colagenolítica de la colagenasa. Cuando la colagenasa hidroliza al colágeno modificado, las cadenas alfa se separan y las nanopartículas magnéticas ancladas tienden a agregarse como consecuencia del movimiento térmico induciendo el acoplamiento magnético entre los dominios magnéticos de las mismas magnéticas a medida que estas se agregan.

Una técnica preferida para realizar la medición es la resonancia magnética, donde la acumulación o dispersión de partículas magnéticas se puede medir mediante los cambios en los tiempos de relajación y, por lo tanto, también en el efecto de contraste de tales partículas magnéticas. En algunas realizaciones preferidas de la invención, el colágeno se puede proporcionar, ya sea como cadenas α aisladas o fragmentos de protocolágeno tanto de ocurrencia natural como sintéticos siguiendo un proceso similar para inmovilizar partículas magnéticas que se pueden realizar en cadenas α o monómeros aislados. Las cadenas α puede ser inducidas a adoptar una estructura de triple hélice, como ejemplo, con la suspensión o disolución en ellas un medio ácido tratamiento con pepsina, lavado, el filtrado, lavado, el filtrado y la recogida de los precipitados. La figura 4 muestra un esquema de un tripéptido colágeno modificado (A), funcionalizada con nanopartículas de magnetita (B). El dibujo no está en escala y la distribución de las nanopartículas de magnetita no es necesariamente coincidente con una distribución real. La figura 5 muestra el efecto de la actividad colagenolítica sobre la distribución de las nanopartículas magnéticas primeramente inmovilizadas en colágeno después de que el colágeno es digerido por colagenasas.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1 muestra la evolución en la relajación magnética nuclear en función del tamaño de partícula o el estado de agregación, de acuerdo con una realización de la invención. Se puede ver la relajación magnética, medida en $ms^{-1}$, a distintas concentraciones, medidas en mM de hierro por litro, producida por tres suspensiones distintas de partículas: 10 nm dispersas por sonicación (triángulos), 50 nm dispersas por sonicación (cuadrados) y de 10 nm agregadas (rombos).

Figura 2 representa la curva de magnetización M-H de colágeno tipo IV modificado con nanopartículas superparamagnéticas de magnetita con un diámetro de 10 nm en 10 ml de suspensión salina e inmovilizado en agarosa, de acuerdo con una realización de la invención. El eje horizontal representa al campo H aplicado y el eje vertical a la magnetización M medidos en amperios por vuelta sobre metro.

Figura 3 representa la curva de magnetización H-M de una suspensión preparada tal como se indica para la figura 2 inmovilizada en agarosa después de la incubación con colagenasa durante 12 horas a 37 º C, de acuerdo con una realización de la invención. El eje horizontal representa al campo H aplicado y el eje vertical a la magnetización M, ambos medidos en amperios por vuelta sobre metro.

Figura 4 muestra un esquema de una triple región helicoidal de colágeno modificado (A), funcionalizado con nanopartículas de magnetita (B), de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 5 muestra el efecto de la actividad colagenolítica sobre la distribución de las nanopartículas magnéticas primero inmovilizadas en colágeno y después de que dicho colágeno es digerido por colagenasas, de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 6 muestra la comparación de mapas de T2 vistos a través de su eje axial de dos tubos de muestras (C) y (D), en los que 0,5 mg de colágeno modificado para tener funcionalidad magnética mediante la inmovilización de partículas de magnetita de 10 nm de diámetro sin modificaciones de superficie en el 10% de sus lisinas. En ambos tubos dicho colágeno modificado está inmovilizado en una suspensión 1 ml de de 10% de agarosa en solución de 10 mM de cloruro de calcio y 400 mM de cloruro de sodio a pH 7,4 habiendo sido añadido 1mg de colagenasa solamente en el tubo C. Siendo el tubo D un control. Ambos tubos fueron puestos en incubación por 1h a 37º C. El promedio de los mapas de T2 de ambos tubos es 168 ms para (C) y 150 ms para (D), de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 7 muestra la comparación de mapas de T2 vistos a través de su eje axial de dos tubos de muestras (E) y (F), en los que 0,5 mg de colágeno sin modificar como control. En ambos tubos dicho colágeno está inmovilizado en una suspensión de 10% de agarosa en 1 ml de solución de 10 mM de cloruro de calcio y 400 mM de cloruro de sodio a pH 7,5 habiendo sido añadido 1mg de colagenasa solamente en el tubo (E). Siendo el tubo (F) un control. Ambos tubos fueron puestos en incubación por 1h a 37º C. El promedio de los mapas de T2 de ambos tubos es 191 ms para (E) y 189 ms para (F), siendo estos tiempos de relajación distintos a los observados en el colágeno modificado de la figura 6, de acuerdo con una realización de la invención. Las diferencias de los tiempos de relajación en los mapas de T2 es difícil de percibir visualmente como se ve en esta figura.

Figura 8 muestra en forma esquemática la activación de (3-aminopropil)-trietoxisilano (APTES) (G), con anhídrido glutárico (H) mediada por N,N-diisopropiletilamina (DIEA) (I), para facilitar la unión a un grupo carboxilo perteneciente a una lisina de colágeno, de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 9 muestra en forma esquemática la modificación de un grupo carboxilo perteneciente a una lisina de colágeno (K), mediante el enlazamiento de APTES modificado (J) como se muestra en la figura 8, mediado por diisopropil carbodiimida (DIPCD) (L), para permitir el anclaje de una partícula de magnetita sin modificaciones de superficie en el colágeno modificado (M), de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 10 muestra en forma esquemática la unión de un grupo carboxilo perteneciente a un monómero de polilisina (N) con APTES activado (J) como se muestra en la figura 8, mediado por DIPCD (L), para producir polilisina modificada por APTES (Ñ) para facilitar el anclaje a una nanopartícula, de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 11 muestra la modificación de una partícula de magnetita sin modificaciones de superficie (O), con al menos una polilisina modificada (Ñ) como la mostrada en la figura 10, para producir una partícula magnética modificada con una polilisina (R), la cual puede enlazarse mediante la intervención de carbodiimidas a una lisina de colágeno endógeno, de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 12 muestra la modificación del grupo n-acetilamino de un monómero de condroitín sulfato (S), mediante el enlazamiento de N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) (T), para permitir el anclaje de una partícula de magnetita modificada en su superficie con ácido dimercaptosuccínico (U), de acuerdo con una realización de la invención.

**EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la

presente invención.

EJEMPLO 1 - PREPARACIÓN DE UN COMPUESTO CON FUNCIONALIDAD MAGNÉTICA MEDIANTE MODIFICACIONES DE COLÁGENO CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS SIN MODIFICACIONES DE SUPERFICIE

El colágeno de tendón bovino del tipo comercial tiene una estructura de triple hélice y probadas propiedades como sustrato de la actividad colagenolítica. La selección de fragmentos de colágeno con estructura triple helicoidal se puede hacer a través de un tratamiento con pepsina y posterior filtrado. La eficiencia de este último proceso puede ser corroborada por dicroísmo circular.

Para modificar este tipo de colágeno primero se une APTES a sus lisinas. El APTES se activa con anhídrido glutárico para conformar un complejo. Esta reacción se lleva a cabo con N, N-diisopropiletilamina (DIEA). El APTES, anhídrido glutárico e IDEA, se disuelven en acetonitrilo en una proporción de 1:1:3 y se ponen en agitación durante 24 horas en una atmósfera seca. El colágeno se disuelve en medio ácido con un difractante como puede ser el manitol y se pone a liofilizar. Se suspende y homogeniza el colágeno liofilizado en acetonitrilo, se añade la mezcla resultante al APTES activado en una relación 28:1 respecto al mismo, se añade diisopropil carbodiimida (DIPCD) en una relación 1:1 y se pone a mezclar en atmósfera seca por otras 48 horas. El acetonitrilo es reemplazado por etanol mediante evaporación y los excedentes de APTES, otros compuestos distintos al colágeno, son eliminados por repetidas centrifugaciones y la preparación se suspende otra vez en etanol. Partículas de magnetita de menos de 15 nm de diámetro en suspensión en un medio básico, generalmente acuoso, se mezclan en etanol en una proporción de etanol / agua de al menos 98:1 y se someten a sonicación. Se añaden a la mezcla y se pone otra vez a mezclar en atmósfera seca por otras 48 horas. El etanol es reemplazado mediante evaporación por agua estabilizada a pH 3.5 con ácido acético y es puesta en agitación por 8 horas a 4ºC. La suspensión resultante se ultracentrífuga durante 14 horas sobre un colchón de iodoxinadol. El colchón superior es retirado y puesto a dializar durante 24 horas dentro de tubos de membrana con poros de 30KD a 4ºC. Una vez dializada la preparación, se puede añadir manitol o algún sufractante alternativo y la preparación se liofiliza.

Los excesos se pueden eliminar a través de columnas, gradiente centrifugación o separación magnética, dializados y liofilizados. La formulación resultante es útil para la detección de la actividad colagenolítica in vivo, in vitro o ex vivo. Debido a la estructura de triple hélice del colágeno, una vez que el colágeno modificado para tener funcionalidad magnética es degradado por una colagenasa las partículas magnéticas originalmente inmovilizadas en éste tenderán a agregarse o dispersase en función de su distribución basal a lo largo de las cadenas del colágeno.

Inmovilizando 3 mg de preparación del colágeno modificado para tener funcionalidad magnética descrito en este ejemplo en una suspensión 1 ml de 10% de agarosa en solución de 10 mM de cloruro de calcio y 400 mM de cloruro de sodio a pH 7,5 y habiendo sido añadido 1mg de colagenasa se observó un tiempo de relajación T2 de 170 ms medido mediante un equipo de RMI de 4,7 T. En ausencia de colagenasa el valor de T2 observado fue de 150 ms. Cuando se utilizó colágeno sin modificar los tiempos de relajación fueron de 191 ms y 189 ms para muestras con o sin colagenasa respectivamente.

EJEMPLO 2- PREPARACIÓN DE UN COMPUESTO CON FUNCIONALIDAD MAGNÉTICA EN LA FABRICACIÓN DE UN IMPLANTE

En este ejemplo primero se une APTES a polilisina para luego anclar las partículas modificadas. Esta polilisina modificada puede unirse al colágeno mediante entrecruzamientos mediado por la enzima lisil oxidasa. La polilisina se activa con anhídrido glutárico previamente a su unión al APTES. Esta reacción de activación se lleva a cabo disolviendo APTES, anhídrido glutárico y N, N-diisopropiletilamina (IDEA) en acetonitrilo en una proporción de 1:1:3. Posteriormente, se agita durante 24 horas en una atmósfera seca. Se suspende la polilisina en acetonitrilo, se añade la mezcla resultante al APTES activado en una relación 1:1 respecto al mismo, junto con DIPCD en una relación 1:1 y se mezcla en atmósfera seca por otras 48 horas. El acetonitrilo es reemplazado por etanol mediante evaporación y los excedentes de APTES y otros compuestos distintos a la polilisina modificada son eliminados por repetidas centrifugaciones y re-suspensión en etanol. Partículas de magnetita de menos de 15 nm de diámetro en suspensión en un medio básico acuoso, se mezclan con etanol en una proporción etanol/ agua de al menos 98:1. Se sonica, añaden a la mezcla de polilisina modificada en etanol previamente obtenida y se pone otra vez a mezclar en atmósfera seca por otras 48 horas. El etanol es reemplazado por agua mediante evaporación, se estabiliza a un pH básico para mantener la estabilidad de las partículas modificadas.

Una solución de 1,5 mh/ml de colágeno Tipo I en ácido acético al 0,1 estabilizada a pH 7,4 con 0.4 M NaOH en 10X D-PBS y 250mM HEPES, se añade 0,02 mg/ml de lisisl oxidasa en25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 20% glicerol y 3 mM DTT, las partículas magnéticas funcionalizadas con polilisinas en una concentración final de 1mM, ácido hialurónico a una concentración final menor del 1%, se vuelve a estabilizar la mezcla a pH 7,4 y se deja incubar por 72 h a 4ºC. Luego de la incubación se realizan lavados y sonicaciones a 4ºC con un a solución de NaOH a pH 8. Finalmente se pone a incubar el gel a 37ºC por 45 minutos.

Las partículas magnéticas modificadas con polilisinas se unen al colágeno mediante la transformación de las lisinas en alisinas por parte de la enzima lisil oxidasa la cual también facilita enlaces alisina- alisina. El gel resultante es semisólido y, una vez implantado el mismo, capaz de reemplazar tejido conectivo. La implantación de dicho implante conlleva la invasión al mismo por fibroblastos los cuales secretan colagenasas y a su vez degradando el colágeno propio del implante y reemplazándolo por colágeno con una morfología similar a la del tejido circundante. La anterior degradación de colágenos causa la agregación de las partículas magnéticas la cual se puede detectar mediante mapas de imagen de resonancia magnética ponderada.

EJEMPLO 3 MODIFICACIÓN DE CADENAS DE CONDROITÍN SULFATO PARA SER INCLUIDAS EN IMPLANTES DE CARTÍLAGO

Sales de condroitín sulfato se disuelven en una solución de 10 mM de ácido 4-(2-hydroxiethil)-1-piperazinetanesulfonico) HEPES. Se añaden nanopartículas de magnetita funcionalizadas con ácido dimercaptosuccínico inmovilizado sobre su superficie, con una concentración de hierro aproximadamente 1 molar respecto a monómeros de condroitín sulfato, junto a N-(3-Dimetilaminopropil)-N′-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) en un exceso de 1,21:1 también respecto a los monómeros de condroitín sulfato. La suspensión resultante es estabilizada a pH 7,4, se deja en agitación a 4ºC por 24 h y el excedente es eliminado por filtración o diálisis. Las nanopartículas funcionalizadas con condroitín sulfato se añaden a mezclas acuosas de condroitín sulfato adicional, otros glicosoaminglicanos o glicoproteínas utilizadas en implantes de cartílago. La mezcla se agita para formar un gel. Dicho gel puede ser incluido en implantes de cartílago y actuar como reportero de la actividad las hidrolasas de condroitín sulfato o sulfatasa, las cuales cumplen un rol en la regeneración del cartílago.

EJEMPLO 4 FABRICACIÓN DE UN GEL COMPRENDIENDO UN COLÁGENO CON FUNCIONALIDAD MAGNÉTICA

Una solución de 1,5 mg/ml de colágeno Tipo I en ácido acético al 0,1% se estabiliza a pH 7,4 con 0,4 M NaOH en 10X D-PBS y 250mM HEPES, se añade ribosa hasta llegar a 250 mM, una suspensión de colágeno con funcionalidad magnética a una concentración de 1,5 mg/ml, ácido hialurónico a una concentración final menor del 1%, se vuelve a estabilizar la mezcla a pH 7,4 y se deja incubar por 72 h a 4ºC. Posteriormente, se realizan lavados y sonicaciones a 4ºC con un a solución de NaOH a pH 8. Finalmente se pone a incubar el gel a 37ºC por 45 minutos.

El gel resultante es semisólido puede ser utilizado para ensayos in vitro o, formar un implante que una vez implantado el mismo, capaz de reemplazar tejido conectivo. La inclusión de ácido hialurónico favorece la invasión al mismo por fibroblastos los cuales secretan colagenasas y a su vez degradando el colágeno propio del implante y reemplazándolo por colágeno con una morfología similar a la del tejido circundante. La anterior degradación de colágenos causa la agregación de las partículas magnéticas la cual se puede detectar mediante mapas de imagen de resonancia magnética ponderada.

EJEMPLO 5: FABRICACIÓN DE UN IMPLANTE COMPRENDIENDO UN ÁCIDO HIALURÓNICO CON FUNCIONALIDAD MAGNÉTICA

Siguiendo las condiciones descritas en el ejemplo 4, se reemplaza el colágeno con funcionalidad magnética por una solución del 2% de ácido hialurónico con funcionalidad magnética estabilizado a pH 7,4. El implante obtenido permite detectar la degradación de dicho implante por parte de la actividad de la hiluronidasa.

También es posible combinar en forma concéntrica varios tipos de implantes haciendo gelificar una nueva incubación a 4ºC sobre un implante ya preparado, pero con un compuesto con funcionalidad distinta. De esta manera se puede en un mismo implante detectar más de una actividad enzimática dependiendo en que región del mismo ocurra.

EJEMPLO 5 FABRICACIÓN DE UN IMPLANTE INYECTABLE COMPRENDIENDO UN ÁCIDO HIALURÓNICO CON FUNCIONALIDAD MAGNÉTICA

Una suspensión de 4 mg/ml de colágeno Tipo I con funcionalidad magnética en ácido acético al 0,1% es

mezclada con una solución de ácido hialurónico a una concentración del 3% también en ácido acético al 0,1%. La mezcla es estabilizada a pH 7,4 con 0.4 M NaOH en 10X D-PBS y 250mM HEPES a 4ºC y se lleva a una concentración final de 1 mg/ml de colágeno Tipo I con funcionalidad magnética y 1% de ácido hialurónico a pH7,4.

El gel resultante, una vez implantado el mismo, es capaz de dar elasticidad y reemplazar tejido conectivo una vez inyectado. La presencia de ácido hialurónico favorece la invasión al mismo por fibroblastos los cuales secretan colagenasas y a su vez degradando el colágeno propio del implante y reemplazándolo por colágeno propio. La anterior degradación del colágeno causa la agregación de las partículas magnéticas la cual se puede detectar mediante mapas de imagen de resonancia magnética ponderada.

## REIVINDICACIONES

1. Implante o gel que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas.

2. Implante o gel según la reivindicación 1, donde las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

3. Implante o gel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glicoaminglicano y una combinación de éstos.

4. Implante o gel según la reivindicación 3, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos.

5. Implante o gel según la reivindicación 4, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroítin sulfato y ácido hialurónico.

6. Compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas, para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular.

7. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 6, donde las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

8. Compuesto con funcionalidad magnética según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glicoaminglicano y una combinación de éstos.

9. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 8, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos.

10. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 9, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroítin sulfato y ácido hialurónico.

11. Uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular.

12. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 11, para monitorizar la regeneración de tejido conectivo.

13. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 11, para monitorizar la integración biológica de un implante en un ser humano u otro ser vivo.

14. Compuesto con funcionalidad magnética que comprende un sustrato de al menos una enzima y una pluralidad de partículas magnéticas, caracterizado porque
i) las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o
ii) las partículas magnéticas están funcionalizadas con grupos carboxílicos.

15. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 14, donde las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas.

16. Compuesto con funcionalidad magnética según una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie.

17. Compuesto con funcionalidad magnética según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, glicoaminglicano y una combinación de éstos.

18. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 17, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, fibrilina, elastina, laminina, osteacalcina, condroitín sulfato, ácido hialurónico, osteanectina, osteopontina, gelatina y una combinación de éstos.

19. Compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 18, donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico.

20. Procedimiento de obtención de un compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizado porque dicho procedimiento comprende:
a) modificar el sustrato de al menos una enzima, e
b) inmovilizar una pluralidad de partículas magnéticas que no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie en el compuesto modificado obtenido en la etapa a).

21. Procedimiento de obtención de un compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 20, donde en la etapa a) el sustrato reacciona con un aminosilano en un medio orgánico con un contenido de agua máximo del 2%.

22. Procedimiento de obtención de un compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 21, donde en la etapa a) el sustrato reacciona con un aminosilano que es (3-aminopropil)-trietoxisilano en un medio orgánico.

23 Procedimiento de obtención de un compuesto con funcionalidad magnética según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, donde el procedimiento comprende una etapa adicional, previa a la etapa a), de activación del grupo amino del aminosilano con anhídrido glutárico y *N,N*-diisopropiletilamina en un medio orgánico.

24. Producto que comprende al menos un compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, donde dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un implante, un gel, una composición farmacéutica y un agente de contraste.

25. Producto según la reivindicación 24, donde dicho producto es un implante o un gel tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

26. Uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, para fabricar un producto tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25, para determinar o discriminar la actividad enzimática de una o más enzimas.

27. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 26, para fabricar un agente de contraste adecuado para detectar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad enzimática de al menos una enzima.

28. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 27, donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en reumatitis, artritis, lesión, enfermedad relacionada con el tejido conectivo, enfermedad de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, enfermedad relacionada con el colágeno, esteatosis, fibrosis, cirrosis, metástasis, regeneración de tejidos, cáncer, enfermedad coronaria, enfermedad del hígado, enfermedad metabólica, infección y enfermedad inflamatoria.

29. Uso del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, para fabricar un implante o gel para monitorizar la regeneración de la matriz celular.

30. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 29, para fabricar un implante o gel para monitorizar la regeneración del cartílago.

31. Uso del del compuesto con funcionalidad magnética tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 o 26 a 30, donde la reacción enzimática provoca un cambio al menos parcial de superparamagnetismo a paramagnetismo.

32 Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 31, donde la determinación de la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática tiene lugar mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en resonancia magnética de imagen, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética electrónica, magnetometría, espectrometría Mössbauer, magnetometría de equipo de interferencia superconductiva cuántica, magnetometría vibracional, dicroísmo circular magnético de rayos X,

resonancia ferromagnética, efecto Kerr magneto óptico, dispersión de luz de Brillouin, inductancia electromagnética, microscopía de fuerza atómica, magnetorelaxometría y una combinación de ellas.

33. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 32, donde la determinación de la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática tiene lugar mediante la resonancia magnética de imagen.

34. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 33, donde la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática se determina mediante un parámetro seleccionado del grupo que consiste en intensidad de señal, tiempo de relajación longitudinal (T1), tiempo de relajación transversal (T2), parámetro de difusión, señal de respuesta a una primera serie de pulsos o señal de saturación l y una combinación de ellos.

35. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según la reivindicación 34, donde la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática se determina analizando dicho parámetro antes y después de la reacción enzimática.

36. Uso del compuesto con funcionalidad magnética según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, donde la variación en una propiedad magnética es indicativa de por lo menos un fenómeno físico seleccionado del grupo que consiste en:
- agregación de las partículas magnéticas,
- agregación del compuesto con funcionalidad magnética o al menos uno de los productos de reacción de este,
- cambio en el tamaño de las partículas magnéticas, y
cambio en el tamaño de partícula de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en el compuesto con funcionalidad magnética objeto de la presente invención, al menos uno de los productos de reacción de éste y una recombinación de los mismos.

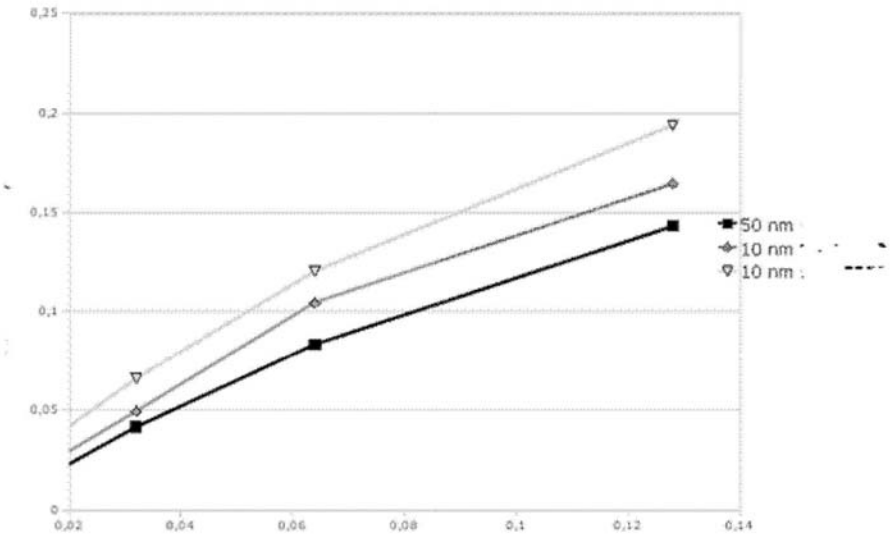



Fig. 1

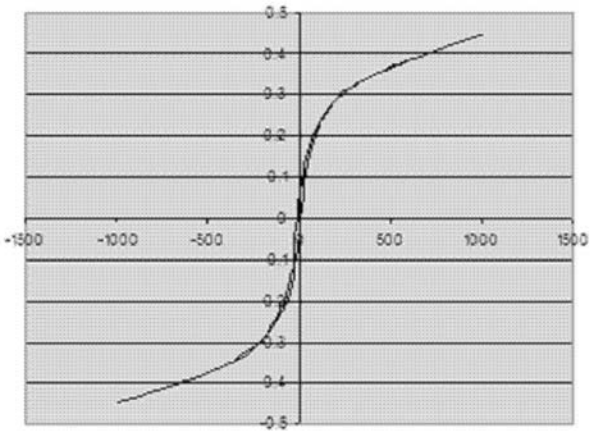



Fig. 2

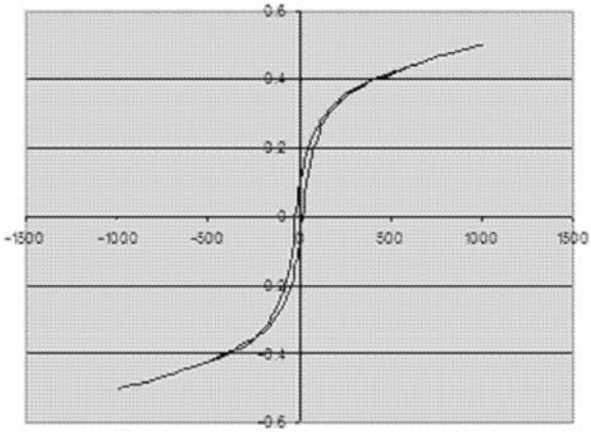



Fig. 3

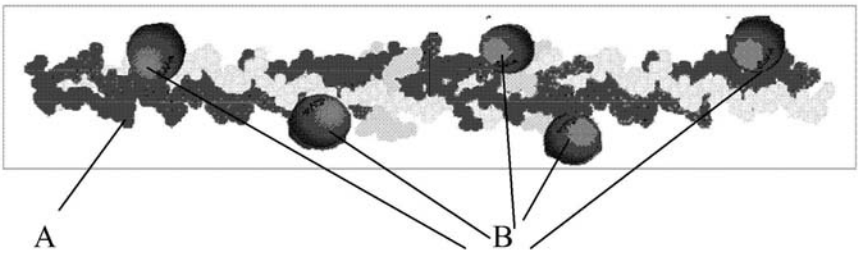
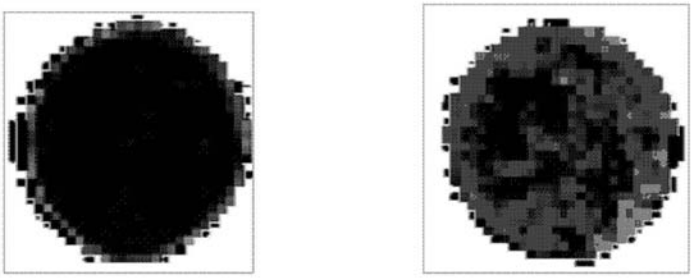



Fig. 4

Fig. 5



C D

Fig. 6

E F

Fig. 7

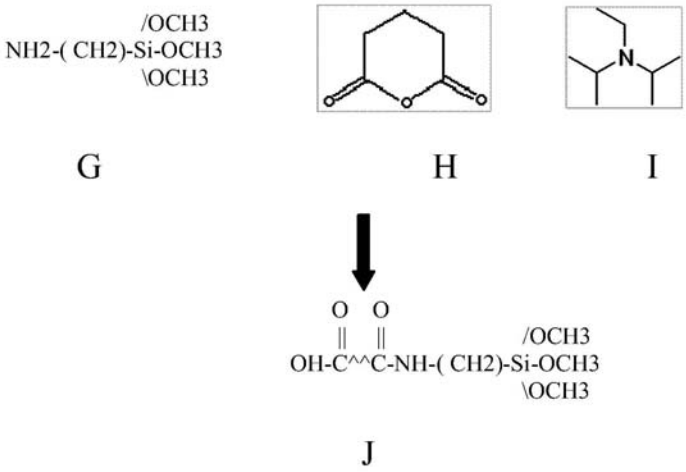

/OCH3
NH2-( CH2)-Si-OCH3
\OCH3
G
H
N
I
O O
OH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
/OCH3
\OCH3
J

Fig. 8

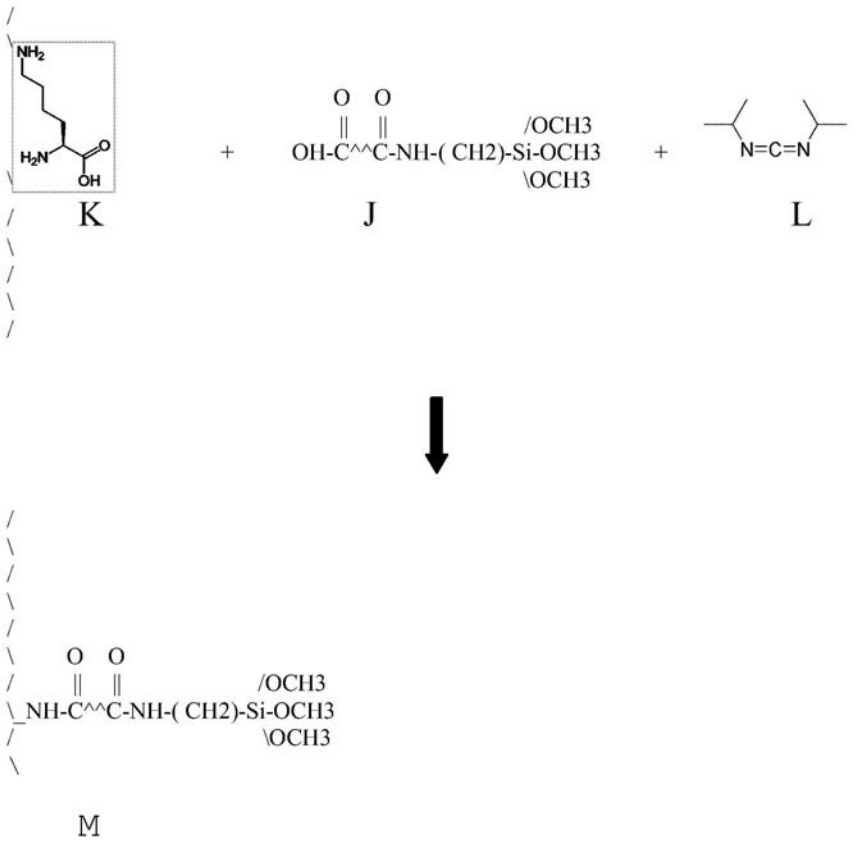

NH2
H2N
O
OH
K
+
O O
OH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
/OCH3
\OCH3
J
+
N=C=N
L
O O
NH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
/OCH3
\OCH3
M

Fig. 9

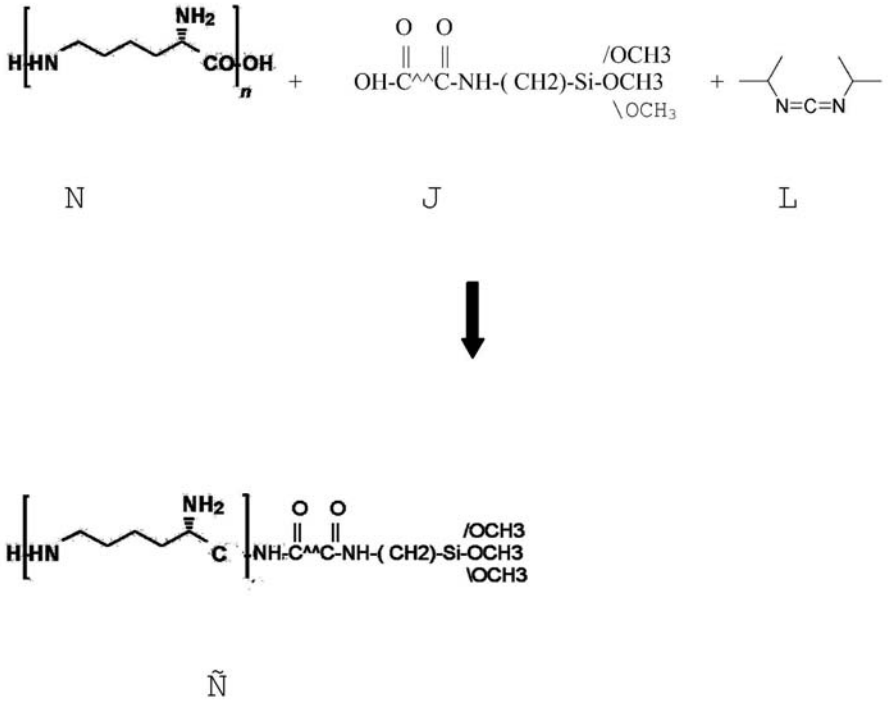
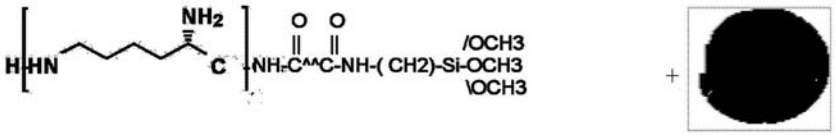
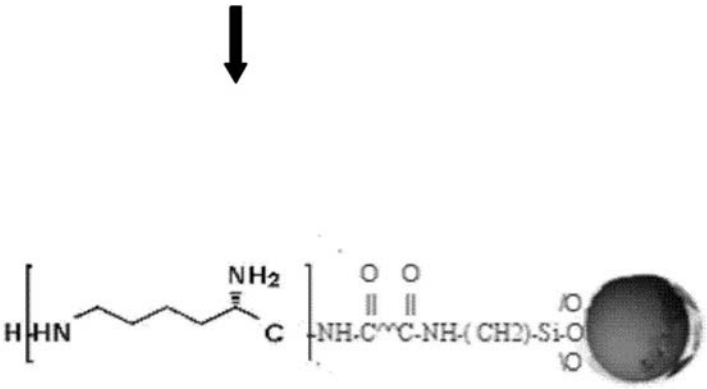

NH2
H-HN
CO-OH
n
+
O O
OH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
/OCH3
\OCH3
+
N=C=N
N
J
L
NH2
H-HN
C
NH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
/OCH3
\OCH3
Ñ

Fig. 10


NH2
O O
/OCH3
H-HN
C
NH-C^^C-NH-( CH2)-Si-OCH3
\OCH3
+

Ñ O


NH2
O O
/O
H-HN
C
NH-C^^C-NH-( CH2)-Si-O
\O

R

Fig. 11

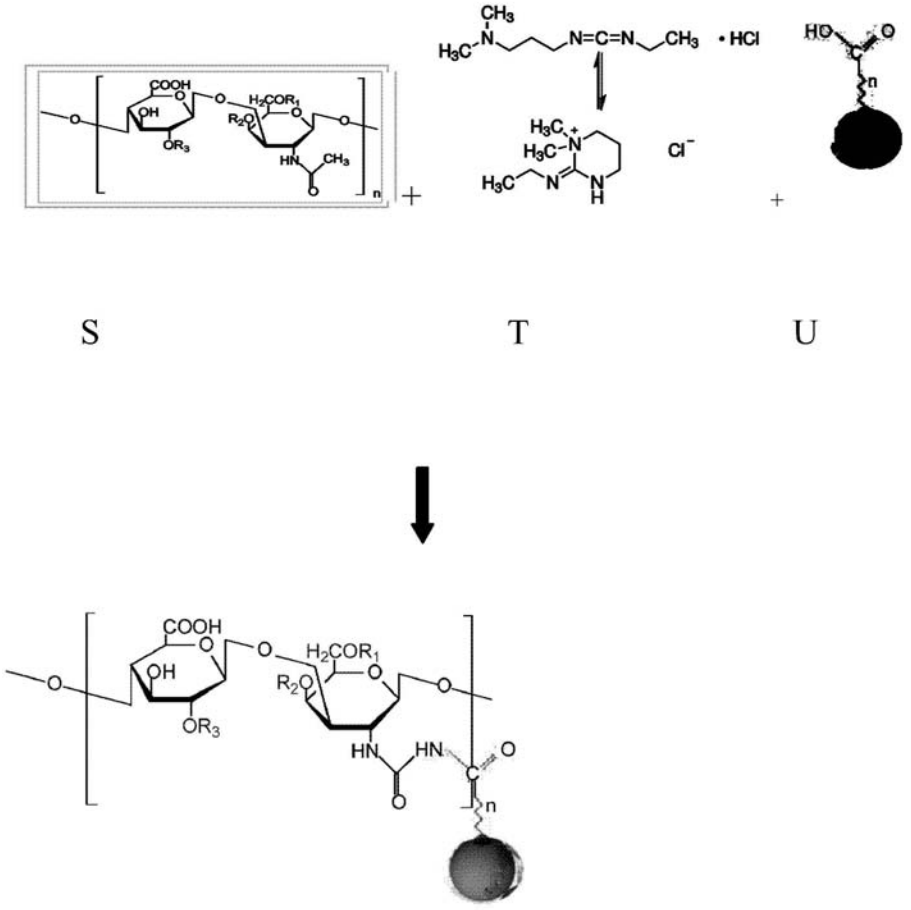



Fig. 12

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201230972

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2012

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| **Categoría** | **(56) Documentos citados** | **Reivindicaciones afectadas** |
|---|---|---|
| X | US 2011182815 A1 (DAICH JULIAN) 28.07.2011, párrafos [0019],[0021]-[0033],[0036],[0046],[0076],[0080],[0097],[0112]-[0115]; resumen; reivindicación 1. | 1-36 |
| A | WO 2011075476 A1 (UNIV ARIZONA et al.) 23.06.2011, párrafos [0010],[0012]-[0014],[0015],[0017]-[0019]. | 1-36 |
| A | US 2003170173 A1 (KLAVENESS JO et al.) 11.09.2003, párrafos [0001],[0002],[0035]-[0042],[0088],[0092],[0093],[0096]-[0098]. | 1-36 |
| A | US 2012107229 A1 (HUANG XUEFEI et al.) 03.05.2012, párrafos [0001],[0004],[0005],[0013],[0089]. | 1-36 |
| A | US 2007166810 A1 (BOBROW MARK N et al.) 19.07.2007, párrafos [0002],[0006]-[0010],[0095],[0127]. | 1-36 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

| **Fecha de realización del informe** | **Examinador** | **Página** |
|---|---|---|
| 17.10.2013 | S. González Peñalba | 1/5 |

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

***A61K49/14*** (2006.01)
***A61K49/18*** (2006.01)
***G01N33/53*** (2006.01)

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

A61K, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPEPSP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2013

**Declaración**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-36 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |
| **Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)** | Reivindicaciones | | **SI** |
| | Reivindicaciones | 1-36 | **NO** |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|---|---|---|
| D01 | US 2011182815 A1 (DAICH JULIAN) | 28.07.2011 |
| D02 | WO 2011075476 A1 (UNIV ARIZONA et al.) | 23.06.2011 |
| D03 | US 2003170173 A1 (KLAVENESS JO et al.) | 11.09.2003 |
| D04 | US 2012107229 A1 (HUANG XUEFEI et al.) | 03.05.2012 |
| D05 | US 2007166810 A1 (BOBROW MARK N et al.) | 19.07.2007 |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente hace referencia a un implante o gel que comprende un compuesto con funcionalidad magnética que comprende a su vez un sustrato de una enzima implicada en la regeneración de la matriz extracelular y una pluralidad de partículas magnéticas (reivindicación 1). Las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas (reivindicación 2). El sustrato se selecciona de entre proteína, polipéptido, glicoproteína, glucosaminoglicado (reivindicaciones 3 y 4), preferiblemente colágeno, condroitín sulfato y ácido hialurónico (reivindicación 5). Se reivindica también el compuesto con funcionalidad magnética para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular (reivindicaciones 7-10) y el uso de dicho compuesto para fabricar un implante o gel para monitorizar una actividad enzimática implicada en la regeneración de la matriz extracelular (reivindicaciones 11-13). Un compuesto con funcionalidad magnética, en el que las partículas magnéticas no presentan ningún recubrimiento o modificación de superficie, o están funcionalizadas con grupos carboxílicos (reivindicaciones 14-19). Procedimiento de obtención del compuesto con funcionalidad magnética (reivindicaciones 20-23). Producto que comprende el compuesto con funcionalidad magnética, que se selecciona de implante, gel, composición farmacéutica y agente de contraste (reivindicaciones 24, 25), y por último el uso de dicho compuesto (reivindicaciones 26-36).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 Y 8 DE LA LP
El documento D01 se refiere a un método para detectar la actividad enzimática de una enzima que comprende combinar una partícula magnética con el sustrato de dicha enzima para formar un sustrato modificado magnéticamente, hacer reaccionar dicho sustrato con la enzima y detectar el cambio en la propiedad magnética de dicho sustrato modificado (véase resumen y reivindicación 1). Las partículas magnéticas son partículas superparamagnéticas (véase párrafo [0019]), entre ellas se encuentran la magnetita (véase párrafo [0046]). El sustrato se selecciona del grupo que consiste en proteína, proteína modificada, polipéptido, polipéptido modificado, glicoproteína, colágeno, fibrilina etc (véase párrafo [0032]). La enzima puede ser una enzima dependiente de metal, tal como proteasa y una metaloproteasa, entre otras (véase párrafo [0033]), además son enzimas implicadas en la regeneración de la matriz extracelular. Dicho método se utiliza para determinar la actividad enzimática de enzimas relacionadas con enfermedades tales como, reumatitis, artritis, enfermedad de Dupuytren, de Peyronie, esteatosis, fibrosis, cirrosis, entre otras (véase párrafo [0036]). En cuanto al procedimiento de preparación de un compuesto con funcionalidad magnética, en el documento D01 se describe que al colágeno de tipo I procedente de tendón bovino se une a sus lisinas aminosilano (ATPS), y después las partículas magnéticas se suspenden en un medio acuoso generalmente ácido y se mezcla en una proporción de etanol/agua de al menos 98:1 y se sonifican (véase párrafos [0112]-[0115] del documento D01 y ejemplo 1 de la presente solicitud de patente). Por otro lado, la determinación de la variación en la propiedad magnética provocada por la reacción enzimática tiene lugar mediante resonancia magnética de imagen (véase párrafo [0076]), y mediante un parámetro tal como el tiempo de relajación (véase párrafos [0021]-[0026]). Además, la variación de una propiedad magnética es indicativa de al menos un fenómeno físico seleccionado de agregación de las partículas magnéticas, agregación del sustrato modificado magnéticamente, entre otros (véase párrafo [0027]-[0031]). Por último, dichos agentes de contraste se pueden incluir en formulaciones de liberación de fármacos (véase párrafo [0080]), y en métodos intravenosos y de encapsulación (véase párrafo [0097]). Por lo tanto, a la vista de dicho documento, se puede decir que la presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, posee novedad, pero carece de actividad inventiva debido a que aunque se reivindica un implante o gel que comprende el compuesto con funcionalidad magnética, en la propia solicitud de patente se dice que los implantes objeto de la invención adecuados, pueden ser geles inyectables, entre otros (véase página 20, líneas 7-9), por lo tanto un gel inyectable sería una forma de administración semejante a las formulaciones farmacéuticas que incluyen métodos intravenosos como formas de administración de dichos sustratos modificados con funcionalidad magnética, ya que las formulaciones farmacéuticas intravenosas son inyectables. Por ello, el que se utilice el implante o gel de la presente solicitud de patente no parece tener actividad inventiva con respecto al documento del estado de la técnica

El documento D02 trata sobre métodos y composiciones de hidrogeles biocompatibles para resonancia magnética de imagen (MRI). Se introducen dichos hidrogeles en la matriz extracelular con el propósito de liberar fármacos o regenerar tejidos, y una vez implantados se monitorizan por MRI. Dichos hidrogeles se preparan a partir de polímeros de compuestos macromoleculares (Véase párrafos [0012]-[0014]) y se unen a un agente de contraste superparamagnético (véase párrafo [0010]). El gel de la matriz extracelular puede ser colágeno (véase párrafo [0015]). El hidrogel puede comprender un precursor enzimático (zimógeno) y posteriormente dicho hidrogel se pone en contacto con una enzima para activar dicho presursor (véase párrafos [0017]-[0019]). El precursor enzimático puede ser entre otros hialuronidasa (véase párrafo [0018]).
El documento D03 hace referencia a agentes de contraste y al uso de dichos agentes de contraste para el diagnóstico de enfermedades en humanos y animales basado en el mapeo de la actividad metabólica (véase párrafo [0001]). Los agentes de contraste son sustratos de enzimas (véase párrafo [0002]). Se diagnostican enfermedades relacionadas con cáncer, inflamaciones e infecciones, enfermedades del sistema nervioso central, etc (véase párrafos [0035]-[0042]). Las enzimas utilizadas son entre otras, metaloproteasas de matriz (véase párrafo [0088]), gelatinasa B (véase párrafo [0092]) y colagenasa (véase párrafo [0093]). La técnica preferida para llevar a cabo la monitorización de la actividad enzimática es la MRI (véase párrafo [0096)). El agente de contraste puede ser un compuesto superparamagnético (véase párrafos [0097] y [0098]).
El documento D04 describe composiciones y métodos para tratar enfermedades ateroscleróticas, infecciones patógenas y tumores, administrando nanopartículas magnéticas dirigidas activamente a una diana (véase párrafo [0001]). Dichas nanopartículas presentan unidos ligandos y pueden estudiarse por resonancia magnética de imagen (véase párrafo [0004]). El ligando puede ser el sustrato de una enzima y encontrarse unido covalentemente (véase párrafo [0013]), ejemplos de dicho ligando es el ácido hialurónico, entre otros, y además dicha nanopartícula comprende un compuesto que puede ser superparamagnético (véase párrafo [0005]), tal como magnetita (véase párrafo [0089]).
El documento D05 hace referencia a métodos y composiciones útiles para detectar actividad enzimática y para diagnosticar deficiencias enzimáticas tales como desórdenes metabólicos (véase párrafos [0002] y [0127]). Pueden evaluarse enzimas tales como metaloproteasas (véase párrafo [0095]).Para llevar a cabo el procedimiento se utiliza un sustrato enzimático unido a una partícula no modificada, pudiendo ser dicha partícula magnética (véase párrafos [0006]-[0010]).
Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, se observa que existen documentos en los que se utilizan compuestos, normalmente sustratos de enzima, funcionalizados magnéticamente, para detectar actividad enzimática. Y muchos de ellos, para detectar la actividad enzimática en la matriz extracelular. Además, en el documento D01 se indica el uso de dichos compuestos en forma de formulaciones que pueden ser administradas intravenosamente, es decir formulaciones que son inyectables, y en la presente solicitud de patente se dice que los implantes objeto de la invención adecuados, pueden ser geles inyectables, entre otros (véase página 20, líneas 7-9 de la presente solicitud de patente), por lo tanto un gel inyectable sería una forma de administración inyectable semejante a las formulaciones farmacéuticas que incluyen métodos intravenosos, como formas de administración de dichos sustratos modificados con funcionalidad magnética. Por ello, el hecho de que se utilice el implante o gel de la presente solicitud de patente sería evidente para un experto en la materia y no parecería tener actividad inventiva con respecto al documento del estado de la técnica D01. Por consiguiente, las reivindicaciones 1-36 se consideran nuevas según el artículo 6 de la LP, pero carecen de actividad inventiva según el artículo 8 de la LP.