

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 855**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2013** **E 13199325 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017** **EP 2886126**

54 Título: **Nanopartícula conjugada a péptidos de unión a CD44**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2017

73 Titular/es:

**EXCHANGE IMAGING TECHNOLOGIES GMBH
(100.0%)
Prinz-Christians-Weg 16
64287 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**ARTZ, CLAUDIA y
GREB, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 639 855 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartícula conjugada a péptidos de unión a CD44

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nanopartículas conjugadas a una proteína capaz de unirse al dominio codificado por el exón 9 del CD44 humano (CD44ex9). La invención se refiere además a un procedimiento de producción para la proteína y las respectivas nanopartículas conjugadas y al uso de los conjugados de la invención para el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades y, especialmente, para cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Estudios extensos de los patrones de transcripción del cáncer han llevado al descubrimiento de objetivos moleculares para distinguir los cánceres malignos de los benignos y los más agresivos de los que son menos agresivos. Los cánceres a menudo sobreexpresan una serie de proteínas, incluyendo ciertos antígenos de superficie celular, por ejemplo, receptores de superficie celular. Los anticuerpos que se unen a tales antígenos de superficie celular sobreexpresados pueden facilitar la detección y el tratamiento de tales cánceres. Se han utilizado varios enfoques para generar anticuerpos contra los receptores de superficie celular de cáncer que pueden usarse como
15 diagnósticos o terapéuticos potenciales. La identificación de los receptores de superficie celular sobreexpresados y de los anticuerpos que se unen a ellos proporciona una vía para el desarrollo de terapias contra el cáncer, especialmente para los subtipos de cáncer con mal pronóstico y resistencia a terapias tradicionales. CD44, CA19-9 y CEA son dichos receptores de superficie celular sobreexpresados, que se sabe que son relevantes para la progresión y la malignidad tumoral.

20 CD44, una molécula de adhesión principal para la matriz extracelular, ha estado implicada en una amplia variedad de procesos fisiológicos, incluyendo el direccionamiento y la activación de leucocitos, la cicatrización de heridas y la migración celular, así como en la invasión de células tumorales y la metástasis (Günthert y col., 1991; Nagano y Saya, 2004; Ponta y col., 2003).

25 CD44 es una molécula de cadena única que comprende un dominio extracelular N-terminal conservado, una región proximal de membrana no conservada, una región variable que expresa diversas combinaciones de exones variantes, un dominio transmembrana conservado y una cola citoplásmica conservada. El mapa genómico de CD44 incluye 5 exones constantes en el extremo 5' y 5 exones constantes en el extremo 3'. El gen CD44 de ratón incluye también 10 exones variantes en el centro de la molécula designada V1-V10, lo que da como resultado un total de 20 exones. El gen CD44 humano comprende solo 9 de estos 10 exones variantes (V2-V10), comprendiendo de este modo un total de 19 exones. El empalme alternativo diferencial genera muchas isoformas de CD44 que expresan
30 diversas combinaciones de exones variantes (denominados Exón V_x, x = 1 a 10), que se insertan en el dominio proximal de la membrana y constituyen la región variable de la molécula. Estas moléculas se denominan variantes de CD44 (CD44v). Hasta la fecha, se conocen 20 isoformas de CD44.

35 Mientras que la isoforma CD44 estándar (CD44s) se expresa predominantemente en células hematopoyéticas y subpoblaciones de células epiteliales normales, se ha descubierto que las variantes de CD44 con inserciones en la región extracelular proximal de la membrana eran abundantes en diversos tumores humanos, incluyendo carcinomas de colon, de mama, gástrico, vejiga, de próstata y diversas neoplasias hematopoyéticas. Informes adicionales sugirieron una estrecha correlación entre la expresión del CD44 variante y la progresión tumoral y, en particular, la diseminación linfática de células neoplásicas.

40 En conjunto, estas observaciones apuntan a una función importante de las variantes CD44 en la iniciación tumoral y el mantenimiento de células cancerosas además de sus funciones más establecidas en la adhesión y migración celular.

45 Además del papel de CD44 en el cáncer, también se ha sugerido que el CD44 es un potencial objetivo en enfermedades autoinmunes. Se ha publicado (Hale y col., 1992) que la administración de una proteína o péptido de CD44 se puede usar para tratar diversas enfermedades autoinmunes.

Basándose en el papel establecido de CD44 en cáncer y en las enfermedades autoinmunes, también se han generado anticuerpos monoclonales dirigidos contra diversas regiones variantes de CD44 como agentes potenciales para el diagnóstico o el tratamiento de trastornos relacionados con CD44.

50 Seiter y col., describen mAb dirigidos contra variantes específicas de metástasis de la proteína de superficie CD44 de un adenocarcinoma pancreático de rata (Seiter y col., 1993). Estos anticuerpos se proponen para producir inmunosupresión para el tratamiento terapéutico de trastornos inmunorreguladores incluyendo, por ejemplo, enfermedades del tipo reumático. También se han proporcionado anticuerpos monoclonales reactivos con CD44 que inhiben la proliferación de linfocitos T para el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes. También se ha indicado que los anticuerpos monoclonales que se unen a formas de CD44 que contienen el péptido exón v6 son
55 útiles para diagnosticar enfermedades inflamatorias (Jalkanen y col., 1986).

- 5 El documento WO 91/17248 A1 se refiere al uso de anticuerpos anti-CD44v para la terapia y el diagnóstico de tumores. El documento WO 95/00851 A1 se refiere al uso de anticuerpos dirigidos contra los exones variables de CD44 para el diagnóstico de tumores. El documento WO 95/04547 A1 desvela el uso de anticuerpos anti-CD44 dirigidos especialmente contra epítomos dentro de la secuencia del exón v5 para fines inmunoterapéuticos e inmunogammagráficos. Un anticuerpo anti-CD44 dirigido contra el exón v6 se desvela en el documento WO 95/33771 A1. Adicionalmente, el documento EP 0 538 754 A2 enseña el uso de anticuerpos dirigidos contra variantes de CD44 para la inmunosupresión.
- 10 Los anticuerpos anti-CD44 de la técnica anterior muestran varias desventajas. Representan moléculas grandes y complejas que tienen que generarse mediante procedimientos de producción recombinante. De este modo, el proceso de producción es elaborado, costoso y tiene que cumplir estrictos requisitos reglamentarios. Adicionalmente, la necesidad de un potencial inmunogénico reducido requiere la generación de anticuerpos humanos o humanizados.
- 15 La entrada de base de datos n.º ADR58907, recuperada del número de referencia EBI. GSP: ADR58907 (BASE DE DATOS Geneseq [Online] 18 de noviembre de 2004, "Human Elk1 phosphorylation/Eik1 kinase activation protein-SEQ ID 10.") y el documento WO 2004/072277 A2 (ASAHI KASEI PHARMA CORP [JP]; MATSUZAKI OSAMU [JP]; MATSUDA AKIO [JP]; 26 de agosto de 2004) desvelan un péptido de 184 aminoácidos que es un 100 % idéntico a la SEQ ID No. 2 de la presente solicitud en un solapamiento de 32 aa. De manera notable, esta entrada de base de datos no enseña ninguna unión a CD44.
- 20 La entrada de base de datos. n.º AWW72632 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP:AWV72632, DATABASE Geneseq [Online] 9 de julio de 2009, "Human pancreatic cancer associated target (PCAT) protein, SEQ ID14.") y el documento US 2009/138977 A1 (DOMON BRUNO [US] y col.; 28 May 2009) desvelan una proteína de 198 aminoácidos que comprende los aa 33 a 66 de la SEQ ID. No. 4 de la presente invención con solo 1 aminoácido de diferencia. Para dicha proteína no se desvela ninguna unión a CD44. La entrada de base de datos n.º AZM18611 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: AZM18611, DATABASE Geneseq [Online] 13 de octubre de 2011, "Human lung cancer target LCAT protein sequence SEQ: 1.") y el documento US 2011/212085 A1 (JOSELOFF ELIZABETH [US] y col.; 1 de septiembre de 2011) desvelan una proteína LCAT objetivo de cáncer de pulmón humano de 102 aminoácidos que completa la SEQ ID NO: 5 completa de 62 aa de longitud de la presente solicitud. No hay divulgación de unión a CD44.
- 25 La solicitud WO 1995/04547 A1 (Boehringer Ingelheim Int. [OE]; Kernforschungszentrum Karlsruhe [OE]; Adolf G) 16 de febrero de 1995) desvela
- 30 Kenichiro y col., ("Inhibition of liver metastasis formation by anti CD44 variant exon 9 monoclonal antibody", Int. J. Oncology, 1997, vol. 11, n.º 6, páginas 1257-1261) la capacidad de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el exón 9 de la variante de CD44 para inhibir la formación de metástasis hepática. Sin embargo, Kenichiro y col., no mencionan nada sobre los péptidos que se unen al exón 9 de CD44.
- 35 Kimura y col., 2013 ("CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells", Oncotarget, páginas 785-791) indica un papel importante del exón 9 de la variante de CD44 para el inicio del cáncer de colon pero no desvela péptidos de unión a CD4v9.
- 40 Park y col., ("Screening of Peptides Bound to Breast Cancer Stem Cell Specific Surface Marker CD44 by Phage Display", Molecular Biotechnology, 2011, vol. 51, n.º 3, páginas 212-220) se refiere a un cribado de péptido de expresión en fagos contra CD44, pero no desvela ningún péptido relacionado con los péptidos de la presente invención.
- 45 La entrada de base de datos n.º AZV55426 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: AZV55426; database Geneseq [Online] 21 de junio de 2012, "Human derived cancer-associated target protein SEQ ID NO: 673.") y el documento US 8 168 586 B1 (Fang Dong y col., 1 de mayo 2012) desvelan una secuencia con 57 aa y que tiene una identidad del 83,3 % con la secuencia completa de la SEQ ID No: 4 de la presente invención. Dicha proteína se identifica como una proteína diana asociada al cáncer humano. Sin embargo, no hay ninguna referencia de unión al exón 9 de CD44.
- 50 La entrada de base de datos n.º C9J6S2 (UniProt Online database, 3 de noviembre de 2009; "SubName: Full = Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 {EC 0:00003131 Ensembl: ENSP00000418353};" recuperada de n.º de referencia EBI UNIPROT:C9J6S2) y Burkhard y col., ("Initial characterization of the human central proteome", BMC Systems Biology 2011, vol. 5, n.º 1, página 17) desvelan una subunidad beta-3 de ATPasa transportadora de sodio/potasio con 89 aa y que tiene una identidad del 83,3 % con la secuencia completa de la SEQ ID No: 4 de la presente invención. No hay ninguna referencia de unión al exón 9 de CD44.
- 55 La entrada de base de datos n.º AXT76926 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: AXT76926; Geneseq Online, 18 de febrero de 2010; "Human Na-K ATPase beta3 CAT protein SEQ ID: 130.") y el documento US 7 582 441 B1 (Ruben S y col., 1 de septiembre de 2009) desvelan un (01-09-2009) desvelan una proteína beta 3 CAT de la ATPasa de Na-K humana con 57 aa y que tiene una identidad del 89,5 % con la secuencia completa de la SEQ ID No: 4 de la presente invención. No hay ninguna referencia de unión al exón 9 de CD44.

5 La entrada de base de datos n.º ARW93074 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: ARW9307; Geneseq Online 7 de agosto de 2008, "N-linked glycopeptide SEQ: 101.") la entrada de base de datos n.º ARW9307 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: ARW93073, database Geneseq Online, 7 de agosto de 2008, "N-linked glycopeptide SEQ: 100.") y el documento WO 2008/066629 A2 (Inst Systems Biology, Aebersold R, Zhang H, 5 de junio de 2008) desvelan la secuencia ID No: 100 de 25 aminoácidos y la secuencia ID No: 101 de 32 aminoácidos ambas con una identidad del 54,9 % con la secuencia completa de la SEQ ID No: 4.

10 La entrada de base de datos n.º AAM62836 (recuperada del n.º de referencia EBI GSP: AAM62836, database Geneseq Online, 5 de noviembre de 2001, "Human brain expressed single exon probe encoded protein SEQ ID NO: 34941.") y el documento WO 01/57275 A2 (Molecular Dynamics Inc.; Penn Sharron G; Hanzel Oavio K; 9 de agosto de 2001) desvelan una proteína de 63 aminoácidos, expresada en el cerebro y que tiene una identidad del 61,3% con la SEQ ID No: 5 de la presente invención.

De este modo, todavía existe la necesidad de moléculas de unión a variantes de CD44. El objeto de la presente invención es, por tanto, proporcionar una sustancia de unión a la variante de CD44 que supera al menos uno de los inconvenientes mencionados anteriormente.

15 Este problema se resuelve proporcionando una proteína de unión a la variante de CD44 de acuerdo con la reivindicación 1 y un uso de dicha proteína de unión para diagnóstico y tratamiento, especialmente utilizando nanopartículas recubiertas con dicha proteína. Las realizaciones específicas de la invención son objeto de otras reivindicaciones independientes o dependientes.

Sumario de la invención

20 En un primer aspecto, la invención proporciona nanopartículas conjugadas a una proteína capaz de unirse a un polipéptido codificado por el exón 9 de CD44 humano (CD44ex9), dicha proteína comprende o consiste en

- a) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID No. 1 to 5; o
- b) una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos dada en las SEQ ID No. 1 a 5 en su conjunto,

25 en el que dicha proteína tiene una longitud de 100 aminoácidos o menos.

Mediante la realización de una evaluación de dos híbridos de levadura, los inventores fueron capaces de identificar cinco péptidos diferentes con una unión específica al polipéptido codificado por el exón 9 de CD44. Las secuencias de aminoácidos se presentan en la Figura 3 y en la siguiente tabla y se designan como SEQ ID No. 1 a 5.

SEQ ID No.	Secuencia de aminoácidos
1	PGVPGVQLTA NTQSLVLSA FDIAIEVTFI SS
2	PGLQISFAVQ VPVSVQESSP SVQEGIQIV AIE
3	PGGDHERAPA SCYNGERLSS QLSFEVQWET SETLKILVKP LVFVCREVYD PPC
4	PGPYYGKKLH VGYLQPLAAV QVSFAPNNTG KEVTVECKID GSANLKSQDD RDKFLGRVMF KITARA
5	YYPYYGKLLQ PKYLQPLLAV QFTNLTMDTE IRIECKAYGE NIGYSEKDRF QGRFDVKIEV KS

30 Un análisis adicional reveló que se puede derivar una secuencia de consenso a partir de estas secuencias que exhiben la siguiente secuencia de aminoácidos:

PYYGKXLX₃YLQPSFAVQVX₂SXQX₁₀₋₁₄AIE.

Estas secuencias de consenso se designan SEQ ID No. 6 a 10 como se representa en la siguiente tabla, por lo que estas cinco secuencias difieren en la longitud de la secuencia arbitraria X₁₀₋₁₄. Cabe destacar que "X" se define como un aminoácido arbitrario.

35

SEQ ID No.	Secuencia de aminoácidos
6	PYYGKXLXXX YLQPSFAVQV XXSXQXXXXX XXXXXAIE
7	PYYGKXLXXX YLQPSFAVQV XXSXQXXXXX XXXXXAIE
8	PYYGKXLXXX YLQPSFAVQV XXSXQXXXXX XXXXXXXAIE
9	PYYGKXLXXX YLQPSFAVQV XXSXQXXXXX XXXXXXXXAI E
10	PYYGKXLXXX YLQPSFAVQV XXSXQXXXXX XXXXXXXXXXA IE

La capacidad para derivar una secuencia de consenso única que abarca todos los péptidos independientes que interaccionan con CD44 aislado valida adicionalmente los resultados del procedimiento de selección de dos híbridos.

5 Debe hacerse hincapié en que los péptidos de la invención muestran por primera vez que no solo pueden generarse anticuerpos grandes contra epítomos CD44, sino más bien péptidos pequeños con una longitud entre 32 y 66 aminoácidos que se unen de forma específica y selectiva a un dominio de CD44 clínicamente relevante.

En contraste con los anticuerpos (monoclonales) CD44v5 de la técnica anterior, estos péptidos presentan varias ventajas.

10 Puesto que representan péptidos cortos sin la necesidad de formar complejos o puentes disulfuro intramoleculares son mucho más fáciles de producir y purificar.

Como péptidos con una longitud entre 32 y 66 aminoácidos es incluso posible sintetizarlos mediante síntesis en fase sólida (según Merrifield). Esta síntesis proteica *ex vivo* es especialmente ventajosa dados los estrictos requisitos reguladores asociados con la expresión de proteínas recombinantes.

15 Adicionalmente, como péptidos pequeños, pueden estar ventajosamente conjugados o fusionados a una proteína diferente, compuestos específicos o incluso nanopartículas para su uso para tratamiento o diagnóstico.

Como péptidos pequeños son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y las membranas celulares para administrar compuestos a compartimentos a los que no se puede llegar con anticuerpos.

20 Debido a su pequeño tamaño de las proteínas de la invención se reduce considerablemente el riesgo de provocar una respuesta inmune. Debe hacerse hincapié en que el riesgo de inmunogenicidad que es inherente a los anticuerpos altera considerablemente su uso clínico.

Cabe destacar que la proteína de unión a CD44ex9 de la invención, al interferir solo con el dominio variante v5, deja intacta la función de CD44 normal y, por lo tanto, permite una intervención específica.

En resumen, las proteínas de unión a CD44ex9 de la invención abren la puerta a nuevas estrategias para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer con un riesgo reducido de efectos secundarios.

25 **Descripción detallada de la invención**

En una realización de la invención, la invención proporciona una proteína que se une a un polipéptido codificado por el exón 9 de CD44 humano (CD44ex9), dicha proteína comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 95 % y, específicamente, una identidad de al menos 97,5 % con la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID No. 1 a 5.

30 En un aspecto adicional, la solicitud describe una proteína que se une a un polipéptido codificado por el exón 9 de CD44 humano (CD44ex9), dicha proteína comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 90 %, preferentemente de al menos un 95 %, más preferentemente de al menos un 97,5% e incluso más preferentemente de al menos un 100 % de identidad con el motivo de unión a CD44 definido por la secuencia: "PYYGKXLX₃YLQPSFAVQVX₂SXQX₁₀₋₁₄AIE" como se representa en las SEQ ID No. 6 a 10, en la que X indica un aminoácido arbitrario.

35 Las proteínas según se reivindican en el presente documento tienen una longitud de 100 aminoácidos o menos y aún más preferentemente una longitud de 90, 85, 80, 75, 70 o 66 aminoácidos o menos.

40 En una realización adicional de la invención, la proteína de unión a CD44ex9 tiene una alta afinidad con el polipéptido codificado por el exón 9 con un valor de k_i de menos de 10 μ M, preferentemente de menos de 1 μ M, más preferentemente de menos de 100 nM y más preferentemente de menos de 10 nM.

En una realización adicional de la invención, la proteína de unión a CD44ex9 se une selectivamente al polipéptido codificado por exón9, que se administra cuando se une a otras proteínas arbitrarias con un valor de k_i que es, preferentemente, al menos 10 veces menos y, más preferentemente, 100 veces menos del valor k_i para la unión a CD44ex9.

- 5 En una realización, la proteína de unión a CD44ex9 de la invención es capaz de unirse a cada isoforma de CD44 que contiene el dominio codificado por el exón 9, que también se designa "variante 5" (v5).

En una realización preferida, la proteína de unión a CD44ex9 de la invención se une a una isoforma de CD44 seleccionada de la lista que consiste en CD44 v5, CD44 v5-v6, CD44 v3-v6, CD44 v3-v6, CD44 v2-v10, CD44 v3-v10, CD44 V4-v7 y CD44 v4-v10.

- 10 De manera notable, la proteína de unión a CD44ex9 de la invención se une también a proteínas que comprenden junto al dominio v5 también otros dominios variantes tales como v1, v2, v3, v4, v6, v7, v8, v9 y/o v10.

La nanopartícula conjugada de acuerdo con la invención puede, en general, unirse a cualquier tipo de fármaco que perjudique, inhiba o incluso mate células cancerosas. De este modo, es particularmente preferente un agente citotóxico. Ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen emozolomida, carmustina, lomustina, procarbazona, estreptozocina, irinotecán o cualquier combinación de dos o más de estos agentes.

- Ejemplos adicionales de inhibidores de cáncer adecuados son (-)-Ci-Cdp1, (-)-Ci-Cdp2, galato de (-)-epigallocatequina, (+)-Cbi-Cdpi2, (+)-Ci-Cdp2, 10-deacetilbacatina III, 4-demetoxi daunorubicina, 5-azacitidina/5-aza-2'-desoxicitidina, 5-fluorouracilo, clorhidrato de 5-iminodoxorubicina, 6-mercaptapurina, aclarubicina, acodazol, actinomicina D, adenina fosfato, adenosina, aderbasib, adozelesina; U-73, 975, afeletecán, alemtuzumab, alitreninoína, alosetrón HCl, ácido alfitólico, altretamina, alvespimicina, ambazona, ametantrona, amifostina, aminoglutetimida, amsacrina HCl, amsilaroteno, amigdalina, anagrelida, anastrozol, anaxirona, ancitabina, annomontacina, annomuricina A, (C19/C20-eritro), annomuricina B, (C 1 0/C I I, C19/C20-eritro), annomuricina C, (todo-treo) annomuricina E, annonacina, annonacin-IO-Ona, annonacin-A-Ona, annonidina B, annonina VI, annosquamosina A, annosquamosina B, antramicina, apaziquna, argimesna, aristoforina, trióxido de arsénico, artemisinina, ascomicina, asparaginasa, atosibán, atrimustina, axitinib, azasetrón HCl, azatepa, azatioprina, azotomicina, bafetinib, balamapimod, banoxantrona, batabulina, batimastat, Bbr-34384, becatecarina, belotecán, benaxibina, bendamustina, benzodepa, berubicina, betulina, ácido betulínico, aldehído betulínico, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bietaserpina, biricodar, bisantreno, bistramida A; bistrateno A, bizelesina, bleomicina, bleomicina A2 [sulfato], bleomicina A5, sulfato de bleomicina, bortezomib, bosentano, bosutinib, brequinar sódico, brequinar, bropirimina, brostalicina, budotitano, bulatacina, buserelina, busulfán, cabazitaxel, folinato de calcio, levofolinato de calcio, calusterona, camptotecina, canertinib, canfosfamida, cantaridina, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carboprost (carboprost trometamina), carboquona, carfilzomib, ácido carglúmico, carmofur, carzelesina, cedefingol, cernadotina, cetuximab, cevipabulina, clorambucilo, clormetina (mecloretamina), clorotamoxifeno, clorotrianiseno, cioteronel, cisplatino, cladribina, clanfenur, clofarabina, clofazimina, citrato de clomifeno, cordicepina, ácido corosólico, crisnatol, curcumina, ciclocitidina, ciclofosfamida, citarabina, citidina, ácido D-aminolevulínico, dacarbazina, damsina, daniquidona, danuseritib, daporinad, darinaparsina, dasatinib, daunoblastina, daunorubicina/ daunomicina, decitabina, deferasirox, deforolimus, demecolcina, denibulina, detorubicina, dexniguldipina, dexormaplatino, dezaguanina, dianhidrodulcitolium, cloruro de dibrospidio, dienogest, diflomotecán, dinalina, disermolida, docetaxel, dofequidar, mesilato de dolasetrón, dovitinib, doxiluridina, doxorubicina, dromostanolona, duazomicina, duocarmicina, dinemicina, ecomustina, edatrexato, edotecarina, edotreotida, eflomitina, elacridar, eacitarabina, elesclomol, elinafida, elomotecán, elsamitrucina, emitefur, enloplatino, enocitabina, enpromato, entecavir, entinostat, entricitabina, enzastaurina, epirubicina, eptaloprost, eribulina, erlotinib, esorubicina, estramustina, etalocib, etanidazol, etoglucid, etopósido, exatecán, exemestano, exisulind, fadrozol, fazarabina, fiacitabina, floxuridina, fludarabina, fluoximesterona, fluorocitabina, flutamida, formestano, forodesina, fosfluridina tioxil, fosquidona, fostriecina, fotemustina, fotretamina, fulvestrant, fumagilina, galarubicina, galocitabina, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, geroquinol, gigantetronenina, gigantetronenina, gimatecán, gimeracilo, gloxazona, glufosfamida, goniotalamicina, goniotalamicinona, goserelina, granisetrón HCl, gusperimus, hexarelina, homoharringtonina, hidrocampotecina, hidroxycarbamida, hidroxurea, hipericina, ibandronato sódico, ácido ibandronico, idarubicina HCl, idronoxilo, ifosfamida, ilmfosina, imatinib, mesilato de imatinib, imexón, improsulfán, incadronato, indibulina, indisulam, inolitazona, inproquona, intiquinatina, intoplicina, iobenguano, irofulven, irsogladina, ispinesib, ixabepilona, ketotrexato, L-alanosina, laniquidar, ditosilato de lapatinib, laromustina, larotaxel, ledoxantrona, lenalidomida, lentinan, lestaurinib, letrozol, acetato de leuprolida, leuprorelina, lexacalcitol, liarozol, lobaplatino, lonafarnib, lonidamina, losoxantrona, Ly-83583, lisipresina, mafosfamida, mannomustina, manosulfán, marimastat, marinomicina A, masitinib, ácido maslínico, masoprocol, mecloretamina, medorubicina, megestrol, mepitiostana, mercaptopurina, mesna, metotrexato, aminolevulinato de metilo, metomidato, metoprina, meturedpa, miboplatino, midostaurina, mifamurtida, milataxel, miproxifeno, miriplatina, misonidazol, mitindomida, mitoflaxona, mitoguazona, mitomicina, mitonafida, mitoquidona, mitotano, mitoxantrona, mitozolomida, mivobulina, mizoribina, mofarotena, mopidamol, motesanib, motexafino, mubritinib, muricapentocina, muricatacina, mustina HCl, micofenolato mofetil, ácido micofenólico, nedaplatino, nelzarabina, nemorrubicina, neocuproína, neptamustina, neratinib, nigericina, nilotinib, nilutamida, nimustina, ninopterina, nitracrina, nogalamicina, nolatrexed, norcantaridina, ácido nordihidroguaiarético, nortopixantrona, novembichina, obatoclax, octreotida, olaparib, aldehído oleánólico, mepesuccinato de omacetaxina, ombrabulina, omtripolida, ondansetrón HCl, ortataxel, oteracilo, oteracilo

potásico, oxaliplatino, oxisuran, oxofenarsina, ceribato de paclitaxel, palifosfamida, palonosetrón, pamidronato disódico, ácido pamidróico, panitumumab, panobinostat, patubilona, pazeliptina, pazopanib, pegaspargasa, peldesina, pelitininib, pelitrexol, pemetrexed disódico, pentostatina, peplomicina, peretinoína, perfosfamida, perifosina, hidrobromuro de pibrozelesina, picoplatino, pinafida, piposulfan, pirarrubicina, pirfenidona, piritrexim, piroxantrona, pixantrona, plevitrexed, plicamicina, plitidepsina, plomestano, podofilotoxina, pomalidomida, porfimer sódico, pralatrexato, prinomastat, procarbazona HCl, propamidina, cloruro de prospidio, pumitepa, puromicina, pirazofurina, ouarfloxina, raltegravir, raltitrexed, ramosetrón HCl, ranimustina, retaspimicina, reteliptina, riboprina, ritrosulfán, rituximab, roflumilast, romidepsina, ropidoxuridina, roquinimex, rosabulina, rubitecán, sabarubicina, safingol, salirasib, sapacitabina, saracatinib, sardomozida, satraplatino, seabriplatino, seliciclib, semaxanib; SU-5416, semustina, sermorelina, simotaxel, simtrazeno, sitagliptina, sizofurán, soblitodina, sobuzoxano, fenibutirato sódico, sorafenib, ácido esparfósico, esparsomicina, espiroplatino, escualamina, escuamocina, estreptonigrina, estreptovaricina, sufosfamida, sulofenur, sunitinib, swainsonina, tacedinalina, taflupósido, talabostat, talisomicina, talimustina, talotrexina, taltobulina, citrato de tamoxifeno, tandutinib, tanespimicina, tariquidar, tasidotina, tasisulam, taumomustina, tegafur, tegafur-uracilo, telantininib, teloxantrona, temozolomida, tenipósido, ácido tenuazulfán, terameprocol, teriparatida, tesetaxel, testolactona, tezacinibina, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, timopoyetina, tiazofurina, tilomisol, tilorona, timcodar, timonacic, tioguanina, tirapazamina, tocladesina, tomudex, clorhidrato de topotecán, citrato de toremifeno, tosedostat, tositumomab, toxipantrona, trastuzumab, trenimon, tretinoína, triciribina, trilostano, trimetrexato, tetranitrato de triplatino, triptolida, triptorelina, trofosfamida, tropisetron HCl, tubulozol, tiloforina, U-67786, U-68415, U-71184, U-76074, U-78057, ubenimex, uramustina, uredepa, uretano, uridina, ácido ursólico, aldehído ursólico, vadimezán, valrubicina, valspodar, vandetanib, vapreotida, vatalanib; PTK-787, verteporfina, vildagliptina, sulfato de vinblastina, vincristina, vindesina, vinepidina, vinflunina, vinformida, vinfosiltina, vinleucinol, vinleurosina, vinorelbina [Base], sulfato de vinorelbina, vintriptol, vinzolidina, voriconazol, vorinostat, vorozol, wilforlida A, xantomocina A, zalcitabina, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, ácido zoledrónico, zorubicina, zosuquidar o similares, o una combinación que comprende al menos uno de los inhibidores de cáncer anteriores.

Adicionalmente, también se podría usar un fármaco antiangiogénico para la nanopartícula conjugada de la invención. Ejemplos no limitantes son bevacizumab, aflibercept, cediranib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, pazopanib, vatalanib, mesilato de imatinib, cilengitida, angiostatina, endostatina, factor 4 de las plaquetas. Particularmente, dicho fármaco antiangiogénico podría usarse en cualquier combinación de dos o más de los ejemplos indicados.

Los agentes sensibilizadores de radiación representan una clase de fármaco adicional para la nanopartícula conjugada que comprende la proteína de unión a CD44ex9 según la invención. Ejemplos no limitantes son carboplatino, cilengitida, CG841251, derivados de estaurosporina, tales como MK-1775, 4-fenilbutirato, un compuesto que contiene gadolinio, tal como motexafin-gadolinio, un derivado de taxano, tal como paclitaxel o docetaxel, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la solicitud desvela una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de unión a CD44ex9 o el péptido CD44v5 de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la solicitud desvela un vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la proteína de unión a CD44ex9, el péptido CD44v5 o una proteína de fusión del mismo.

En un aspecto adicional más, la solicitud desvela una célula huésped que contiene el vector de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de la proteína CD44ex9, el péptido CD44v5 o una proteína de fusión del mismo.

En un aspecto adicional, la solicitud desvela un procedimiento para producir la proteína de unión a CD44ex9 o el péptido CD44v5, en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 1.) Transformar una célula huésped con una construcción de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la invención o una proteína de fusión respectiva; y
- 2.) Cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para producir la proteína de unión a CD44ex9 o el péptido CD44v5.

En una realización de la invención, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, tales como diabetes insulino-dependiente, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedades de la piel, tales como psoriasis o dermatitis atópica; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal; lesión en los tejidos; enfermedades alérgicas y cáncer.

El uso de la nanopartícula conjugada de la invención para el diagnóstico o tratamiento de la inflamación se basa en el hecho de que CD44 desempeña un papel en la dirección de las células inflamatorias al sitio de infección o destrucción de tejidos. De este modo, el CD44 en los linfocitos T activados, los monocitos o las células endoteliales activadas se une al componente de matriz extracelular hialuronano, induce quimiocinas tales como CCR2 que luego estimula la migración de las células inflamatorias al sitio de la inflamación (Johnson & Ruffell, 2009). El bloqueo de CD44 por la proteína de unión a CD44ex9 o el bloqueo del hialuronano por el péptido CD44v5 evitaría este proceso.

Por ejemplo, la expresión de CD44 se ha estudiado extensamente en pacientes con artritis reumatoide, por lo que se

- ha demostrado que el nivel de expresión de CD44 en células monocíticas en el líquido sinovial de pacientes con AR está elevado. Este aumento en la expresión de CD44 se correlacionó positivamente con el grado de inflamación sinovial en la AR. Adicionalmente, los ratones deficientes en CD44 tienen grados más bajos de artritis y se ha demostrado que el tratamiento con anti-CD44 reduce eficazmente la puntuación de artritis en modelos animales. De este modo, la proteína de unión a CD44-ex9 o el péptido CD44v5 de la invención pueden utilizarse para el diagnóstico o el tratamiento de la AR.
- En una realización adicional de la invención, la nanopartícula conjugada puede usarse para producir inmunosupresión, por ejemplo, para la prevención del rechazo del trasplante mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T.
- En una realización preferente de la invención, la nanopartícula conjugada puede usarse para el diagnóstico o tratamiento del cáncer. Este uso preferente se basa en el hecho de que las variantes de CD44 que comprenden el dominio v5 se han descrito en células cancerosas.
- Debido a la unión específica de la proteína de unión a CD44ex9 al dominio v5 de la proteína CD44, dicha proteína de unión inhibe la interacción de CD44 con diversas proteínas de la matriz extracelular y, por lo tanto, inhibe la unión, la migración y la metástasis de las células tumorales y también puede perjudicar a la proliferación de células tumorales.
- En una realización preferida adicional, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de células madre de cáncer (CSC). Un concepto emergente indica que las CSC determinan, en última instancia, el éxito del tratamiento del cáncer, ya que las células representan una población superviviente a largo plazo que posteriormente conduce a recaídas y metástasis (Deonarain y col., 2009). Se demostró que CD44 se expresaba en las CSC y se le ha hecho responsable de dicha supervivencia a largo plazo y potencial metastásico de los respectivos tumores. Como ejemplo, las CSC del cáncer de mama se caracteriza por la expresión de CD44+/CD24^{bajo}, que argumenta que el CD44 es una prometidora anti-diana de CLC.
- En otra realización de la invención, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de la leucemia linfática crónica (LLC). Zhang y col., (2013) pudieron demostrar que las células de LLC muestran una expresión elevada de CD44 y, además, que los anticuerpos anti-CD44 eran efectivos en la muerte de las de LLC *in vitro* e *in vivo*, con lo que en un modelo de xenoinjerto el tumor desapareció completamente del organismo.
- El diagnóstico o tratamiento del cáncer de mama por la nanopartícula conjugada de la invención se apoya en el hecho de que CD44v5 representa la variante de CD44 más expresada en el cáncer de mama (56 % para CD44v5 frente a 24 % para CD44v6 y 15 % para CD44v8). Además, la expresión de la variante CD44v5 se asocia con un tiempo de supervivencia más corto del cáncer de mama: El tiempo de supervivencia a cinco años es del 71 % en pacientes con cáncer CD44v5 frente al 86 % en pacientes negativos para CD44v5 (Tempfer y col., 1996).
- En una realización preferida, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de cáncer colorrectal, ya que se demostró que CD44v5 (y CD44v6) están asociados con un mal pronóstico en el cáncer colorrectal. De este modo, los pacientes con mayor contenido de CD44v5 o CD44v6 en muestras tumorales tuvieron una supervivencia libre de recaídas considerablemente más corta (Vizoso y col., 2004).
- En otra realización preferida, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de tumores de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), ya que estos tumores exhiben una expresión alta de CD44 y la subpoblación con expresión alta de CD44 son menos sensibles a la radiación y a la quimioterapia (La Fleur y col., 2012).
- En una realización adicional, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse para el diagnóstico o tratamiento de melanomas, ya que un péptido derivado de CD44 mostró eficacia *in vitro* e *in vivo* en un modelo de tumor de melanoma (Piotrowicz y col., 2011).
- En una realización preferida de la invención, la nanopartícula conjugada se utiliza para preparar un agente de contraste para uso médico.
- En una realización preferida adicional, el agente de contraste es capaz de identificar células cancerosas o células de carcinoma *in situ*.
- En una realización específica, la nanopartícula conjugada de la invención es capaz de identificar células cancerosas que se seleccionan de la lista que consiste en células de adenocarcinoma, células de tumores epiteliales del timo, células de carcinoma del cuello uterino, células de linfoma no Hodgkin, células de carcinoma de células pulmonares, células de carcinoma de páncreas y células madre de cáncer.
- Las proteínas de unión a CD44ex9 de la invención pueden estar unidas a nanopartículas de cualquier tipo. En la técnica anterior se conocen diversas clases de nanopartículas y el experto en la materia puede seleccionar el tipo apropiado de nanopartícula de acuerdo con los requisitos terapéuticos o diagnósticos específicos.

Ejemplos de nanopartículas para acoplar a la proteína de unión a CD44ex9 son puntos cuánticos, grupos de metales nobles, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (IONP), micelas de copolímero de bloques, nanocélulas, dendrímeros, nanotubos, polimersomas, nanopartículas XPclad® y nanopartículas que consiste en sílice amorfa rodeada por una capa de fosfato de calcio luminiscente cristalino (por ejemplo, ORMObEAD®).

5 Las partículas de ORMObEAD pueden modificarse adecuadamente en la superficie con polietilenimina o TRIAMO dando grupos amina o ácido 6-amino hexanoico (AHA) o con ácido adípico dando grupos carboxilo. Estos grupos se pueden usar para el acoplamiento a las proteínas de la invención. Dembski y col., (2013) desvelan la tecnología ORMObEAD junto con procedimientos para preparar y usar dichas nanopartículas.

10 En una realización de la invención se usan nanopartículas con núcleo-envoltura de $\text{SiO}_2/\text{Zn}_2\text{SiO}_4:\text{Mn}^{2+}$ y $\text{SiO}_2/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}:\text{Eu}^{3+}$ con diámetros inferiores a 100 nm para acoplar con las proteínas de la invención. Dembski y col., (2011 a, 2011 b) desvelan estas partículas, junto con procedimientos para preparar y usar dichas nanopartículas.

15 En una realización adicional, se pueden usar nanopartículas híbridas marcadas con colorantes luminiscentes. Estas nanopartículas consisten en una matriz de partículas a base de SiO_2 con fluoróforos orgánicos unidos covalentemente. Combinan las propiedades ópticas de las moléculas de colorante orgánico y las propiedades de la matriz de partículas inorgánicas. Como resultado, muestran una mayor resistencia al fotoblanqueo y una disminución de las fugas de colorante. Probst y col., (2012) desvelan nanopartículas respectivas, junto con procedimientos para preparar y usar dichas nanopartículas.

20 En otra realización, pueden utilizarse puntos cuánticos libres de cadmio. Estas nanopartículas muestran emisión brillante en la región visible y del infrarrojo cercano del espectro. Nanoco Technologies Ltd. (Manchester, Reino Unido) desarrollan nanopartículas correspondientes y se desvelan en los documentos WO07/020416 A1, WO08/100276 A2, WO10/52455 A1, WO10/15824 A1, WO10/10329 A2 y WO13/93631 A2, junto con procedimientos de preparación y uso de dichas nanopartículas.

25 En una realización de la invención, se pueden usar los puntos cuánticos semiconductores del grupo I-III-VI (grupo II-aleado) o complejos de nanocristales semiconductores micronizados como los desarrollados por Evident Technologies (Troy, NY, EE.UU.). Estas nanopartículas se desvelan en los documentos WO07/118118 A2, WO08/94292 A1, WO06/17125 A2 o WO05/110916 A2, junto con procedimientos de preparación y uso de dichas nanopartículas.

30 En otra realización se pueden usar nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (IONP), micelas de copolímero de bloques, nanocélulas, dendrímeros, nanotubos, polimersomas y nanopartículas XPclad®. Singh y Lillard (2009) y Xie y col., (2010) desvelan nanopartículas respectivas, junto con procedimientos para preparar y usar dichas nanopartículas.

35 En una realización adicional de la invención, pueden usarse nanopartículas sin Cd, que comprenden un área de núcleo cubierta por un área de envoltura que representa un recubrimiento antirreflectante del área de núcleo. El documento US 2008/0286826 A1 (Philips Intellectual Property & Standards) desvela nanopartículas respectivas, junto con procedimientos para preparar y usar dichas nanopartículas.

40 En otra realización de la invención, se pueden usar partículas magnéticas, que son especialmente adecuadas para la administración dirigida de fármacos. En una realización preferida, dichas partículas magnéticas consisten en óxidos metálicos superparamagnéticos y/o metales y están recubiertas con los péptidos de la invención y, opcionalmente, con uno o más fármacos adicionales. Las partículas magnéticas respectivas se desvelan en el documento EP 1 267 843 A1 (EUCRO) junto con procedimientos de preparación y utilización de dichas partículas magnéticas.

45 Las nanopartículas modificadas se pueden emplear, preferentemente, como agentes de contraste *in vivo* para detectar células CRC. El documento WO 2007/057182 A2 desvela nanopartículas ventajosas, procedimientos de preparación y uso de dichas nanopartículas. Dichas nanopartículas son, en particular, aquellas cuyo diámetro hidrodinámico no excede de 15 nm y que no son inertes en sistemas biológicos.

Las nanopartículas de la invención pueden conjugarse además con al menos una sustancia de unión al antígeno tumoral y/o agente citotóxico.

50 En una realización preferida de la invención, la nanopartícula se conjuga adicionalmente con una sustancia de unión al antígeno tumoral que se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo contra CEA, un anticuerpo contra CA-19-9 y una adhesina o cualquier combinación de los mismos.

En una realización preferida, la adhesina conjugada a nanopartícula está modificada en su secuencia de aminoácidos, y más preferentemente está modificada de acuerdo con el documento WO 2009/106102 A1.

55 Las nanopartículas preferidas de la invención comprenden al menos tres estructuras, a saber, un núcleo inorgánico que está recubierto por una capa que comprende una capa que contiene un componente de imidazol (que también

se denomina en lo sucesivo "capa de pasivación") que, a su vez, porta ligandos específicos, en los que dichos ligandos específicos también pueden formar parte de la capa. Dichos ligandos dan lugar a que la nanopartícula se una específicamente a la diana del sistema biológico.

5 En nanopartículas preferentes, el núcleo inorgánico que incluye la capa de pasivación que lo rodea tiene un diámetro hidrodinámico de no más de 15, si es posible, preferentemente no más de 10 nm. Se prefieren especialmente los diámetros hidrodinámicos de no más de 8 nm o no más de 5 nm. Esto se aplica especialmente a las nanopartículas esféricas. Las nanopartículas de este tamaño se pueden iluminar a través de los riñones y, por lo tanto, no se acumulan, o como mucho se acumulan en cantidades tolerables, en el cuerpo. Esto posibilita la aplicación *in vivo*. Esto se aplica en particular a las nanopartículas que tienen un diámetro hidrodinámico no superior a 5 nm.

10 En una realización alternativa, las nanopartículas también pueden ser de tipo barra. En esta realización, es ventajoso que el diámetro de la barra no supere el límite mencionado anteriormente de 15 nm. Aquí también se da preferencia a diámetros en el intervalo de 5, 8 o 10 nm para facilitar la eliminación del cuerpo. De este modo, por ejemplo, las nanopartículas utilizables de acuerdo con la invención pueden tener dimensiones de longitud/anchura de 8 x 15 nm.

15 Las nanopartículas utilizables de acuerdo con la invención tienen, preferentemente, una emisión máxima a una longitud de onda de entre 600 y 700 nm, por ejemplo de entre 620 y 660, particularmente preferentemente a aproximadamente 625 nm o 655 nm. Dicha emisión es fácilmente visible para el ojo humano, y, por tanto, tales nanopartículas pueden usarse directamente como agentes de contraste para intervenciones médicas. Por consiguiente, en algunas circunstancias se pueden prescindir de los instrumentos ópticos auxiliares.

20 En una realización alternativa, se pueden emplear nanopartículas que superen los diámetros hidrodinámicos mencionados anteriormente de acuerdo con la invención, siempre y cuando se garantice que las partículas no son inertes *in vivo*. Esta última es la condición previa para que dichas partículas sean biodegradables y, como resultado, los metales (por ejemplo, Cd) que están unidos en como partículas inicialmente, se convierten en la forma iónica. Los productos de degradación pueden iluminarse a través de los riñones.

25 Las nanopartículas inorgánicas que tienen una capa de pasivación que contiene un componente de imidazol son, de hecho, no inerte *in vivo*, como se ha demostrado anteriormente, pero se degradan en estas condiciones. Por tanto, dichas nanopartículas satisfacen el criterio de biodegradabilidad y de paso renal de los productos de degradación, lo que es particularmente relevante para la aplicación *in vivo*. Esto fue un hallazgo sorprendente porque la capa de pasivación sirve especialmente también para aumentar la estabilidad química y/o física de las nanopartículas (en este contexto, véanse también los comentarios adicionales a continuación). De este modo, la relación entre, por un lado, la estabilidad de las nanopartículas que se requiere para un buen diagnóstico y, por otro lado, la biodegradabilidad que se requiere para el paso renal de partículas "grandes", es adecuada para su uso como agente de contraste *in vivo*.

30 La tarea principal de la capa de pasivación es aumentar la intensidad de la fluorescencia y la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Los núcleos inorgánicos recubiertos por la capa de pasivación se caracterizan por un rendimiento cuántico de al menos 10 %, ventajosamente de al menos 30, 50 o incluso 70 %. Por rendimiento cuántico en el presente documento se entiende la relación entre la cantidad de luz emitida por una muestra y la cantidad de luz absorbida por la muestra. Ventajosamente, la capa de pasivación tiene un espesor no superior a 1 nm. En este caso, el diámetro del núcleo pasivado aumentó en no más de 2 nm.

35 Ventajosamente, las nanopartículas están dotadas, en cada caso, de modificadores, en particular para mejorar la compatibilidad con el entorno biológico. Preferentemente, el aumento del radio hidrodinámico debido al uso de modificadores no excede de 2 nm. En casos particulares, el espesor de la capa de pasivación y los modificadores también depende de las relaciones de las dos estructuras entre sí y en relación con el núcleo inorgánico.

40 Las nanopartículas preferentemente utilizadas de la invención, si están restringidas en tamaño como se ha mencionado anteriormente, son particularmente adecuadas para el uso como agente de diagnóstico en un paciente vivo. De este modo, la reducción de tamaño aumenta la velocidad de difusión y la profundidad de penetración en el tejido. Esto permite que las nanopartículas se diseminen uniforme y rápidamente en el entorno biológico y, también, la penetración en la medida de lo posible de un tejido (por ejemplo, un tumor) después de la administración local. Asimismo, las nanopartículas de la invención permiten una administración sistémica que también puede llevarse a cabo mediante inyección. Sin embargo, también es posible la administración local, por ejemplo aplicación tópica o administración intra o peritumoral para el tratamiento de tumores.

45 Realizaciones particularmente ventajosas de la invención que comprenden las nanopartículas acopladas a las proteínas de la invención tienen un diámetro hidrodinámico no superior a 8, particularmente preferentemente de no más de 4 nm. Las nanopartículas de este orden de magnitud pueden ya estar iluminadas a través de los riñones y, por lo tanto, no se acumulan, o, como mucho, se acumulan en menor medida, en el cuerpo. Como resultado, las nanopartículas de la invención reducen considerablemente el problema de la toxicidad a largo plazo probablemente asociada a los puntos cuánticos conocidos.

50 Las nanopartículas emiten ventajosamente un espectro fluorescente entre 600 y 700 nm, particularmente preferentemente con una emisión máxima entre 600 y 660 nm, particularmente preferentemente entre 620 y 660 nm.

Dicho espectro de emisión tiene la ventaja de una transmisión en tejido muy alta debido a la baja absorción por la hemoglobina y otras sustancias absorbentes de la luz en un sistema vivo (incluida el agua). La luz de estas longitudes de onda todavía puede ser detectada por el ojo humano y, por lo tanto, permite al médico encargado del tratamiento identificar el tejido marcado sin ningún otro auxiliar técnico de detección complicado (por ejemplo, cámaras CCD). Esto es particularmente ventajoso cuando se utilizan nanopartículas de la invención como agentes de contraste durante la intervención quirúrgica para identificar células que expresan CD44, CEA y/o CA19-9, en particular para discriminar tejidos carcinogénicos y sanos.

En una realización, las nanopartículas preferentemente utilizables son nanopartículas conocidas que tienen un núcleo de, por ejemplo, CdSe, CdS o CdTe, como se ha descrito, por ejemplo, en el documento US 2004/0247861 A1 con referencia a publicaciones científicas. Esta publicación impresa hace referencia también a documentos relativos a la preparación de los materiales de núcleo, por ejemplo, al documento US 6.179.912 B1. Se hace referencia a todo el contenido de estos documentos con respecto a la divulgación de las propiedades de estas nanopartículas conocidas y su preparación. Un procedimiento para preparar nanopartículas también se desvela adicionalmente en el documento US 7.147.712 B2-.

De forma particularmente ventajosa, el núcleo inorgánico de las nanopartículas consiste esencialmente en semiconductores. Estos núcleos emiten luz de varios colores, dependiendo de su tamaño y/o composición individuales, pero todos ellos absorben sobre una banda ancha dentro del mismo intervalo del espectro de luz (rango UV a VIS). Debido al alto desplazamiento de Stokes, los espectros de excitación y emisión están muy separados, lo que permite la excitación simple y simultánea de varias nanopartículas. Tienen espectros de emisión estrechos y simétricos que solo se superponen ligeramente o nada en absoluto. Otras propiedades beneficiosas que son de gran importancia particularmente para mejorar la profundidad de la filtración y el marcaje *in vivo* son el alto rendimiento cuántico de hasta el 80 % y la elevada fotoestabilidad.

Se han desvelado nanopartículas preferentes, por ejemplo, en el documento WO 2005/001889 A2. Por consiguiente, comprenden un núcleo inorgánico hecho de una aleación de al menos dos semiconductores que están distribuidos de forma homogénea o para los cuales hay, en cada caso, un gradiente de concentración dentro de la aleación. Con respecto a la divulgación de la naturaleza y la preparación de dichas nanopartículas, se hace referencia al documento WO 2005/001889 A2 citado anteriormente. Los núcleos pueden desviarse en su tamaño en cada caso en un 5 %.

Por consiguiente, el núcleo inorgánico de las nanopartículas puede comprender una aleación de al menos dos semiconductores, en la que el núcleo tiene una composición homogénea y se caracteriza por una "energía de espacio de banda" que no es lineal a la relación molar de los dos semiconductores.

Como alternativa, el núcleo puede ser no homogéneo, aumentando la concentración del primer semiconductor gradualmente, comenzando desde el centro del núcleo hasta la superficie del núcleo, y disminuyendo gradualmente la concentración del segundo semiconductor desde el centro del núcleo hasta su superficie.

Para ambos núcleos, al menos uno de los semiconductores es un semiconductor del grupo II-grupo VI o un semiconductor del grupo III-grupo V (la definición de grupos corresponde a los grupos de la Tabla Periódica de los Elementos). Por ejemplo, la aleación puede seleccionarse del grupo de las siguientes aleaciones: CdSeTe, CdSSe, CdSTe, ZnSeTe, ZnCdTe, CdHgS, CdHgTe, InGaAs, InGaP, GaAlAs, InGaN. Estos núcleos pueden además llevar un recubrimiento de material inorgánico tal como, por ejemplo, semiconductores (por ejemplo, ZnS). Esta capa adicional es conocida por el técnico experto como "protección" o "envoltura".

Los semiconductores del grupo II-grupo VI y del grupo III-grupo V son generalmente conocidos e incluyen, por ejemplo, $CdS_{1-x}Se_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $CdSe_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $Ga_{1-x}Al_xAs$ y $In_{1-x}Ga_xP$. Se prefiere utilizar los semiconductores $CdSe_{1-x}Te_x$, $CdS_{1-x}Te_x$, $ZnSe_{1-x}Te_x$, $Zn_{1-x}Cd_xTe$, $Cd_{1-x}Hg_xS$, $Cd_{1-x}Hg_xTe$, $In_{1-x}Ga_xAs$, $In_{1-x}Ga_xP$, en los que n es una fracción de 0 a 1.

La relación molar de los semiconductores puede ser cualquier relación molar. Sin embargo, si la aleación comprende CdSSe, se da preferencia a una aleación que tiene la fórmula molecular $CdS_{1-x}Se_x$. Si la aleación comprende CdSTe, se da preferencia a una aleación que tiene la fórmula molecular $CdS_{1-x}Te_x$. Si la aleación comprende ZnSeTe, se da preferencia a una aleación que tiene la fórmula molecular $ZnSe_{1-x}Te_x$. Si la aleación comprende ZnCdTe, se da preferencia a una aleación que tiene la fórmula molecular de CdTe solo. En cada uno de estos casos, x es una fracción entre 0 y 1.

Estos núcleos inorgánicos preferidos de las nanopartículas pueden prepararse usando las siguientes etapas: (i) preparación de una primera solución en condiciones que permiten la formación de nanocristales, (ii) preparación de una segunda solución que comprende un precursor de los semiconductores con una relación molar en una condición que no permite la formación de nanocristales, (iii) adición de la segunda solución a la primera solución que permite la formación de nanopartículas, y (iv) alteración de las condiciones, lo que detiene el crecimiento y la formación de los nanocristales. El procedimiento de preparación de los núcleos se ilustra en el documento WO 2005/001889 A2.

En una realización alternativa, el núcleo inorgánico puede consistir esencialmente en un grupo de metales nobles que comprende, preferentemente, 2 y 27 átomos de metal noble. En una realización preferente, el metal noble se

seleccionó de un grupo que consiste en oro, plata, cobre, platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. El grupo puede tener cargas variables.

Estos núcleos tienen la ventaja de que pueden detectarse fácilmente como nanopuntos individuales, utilizando una excitación débil de la lámpara de mercurio, debido a su fuerte absorbancia y emisión. Las nanopartículas de la invención que contienen estos núcleos pueden utilizarse ventajosamente como marcador de molécula individual fluorescente y marcador de masa.

La expresión "metal noble" se refiere a un grupo de elementos que consisten en oro, plata y cobre, y los metales del grupo de platino (PGM), platino, paladio, osmio, iridio, rutenio y rodio. En realizaciones preferentes de la presente invención, los metales nobles se seleccionan del grupo que consiste en oro, plata y cobre. En una realización particularmente preferente, el metal noble es plata u oro.

El término "grupo" se refiere a un compuesto de 2-27 átomos de un metal. Los grupos son conocidos, entre otros, por los campos de la catálisis química, cerámica, la tecnología de semiconductores y las ciencias materiales. Por lo tanto, un experto en la técnica está familiarizado con su preparación. El documento WO 2004/003558 A1 describe, entre otras cosas, la preparación de grupos de metales nobles y, además, contiene extensas referencias adicionales a este tema. Más específicamente, desvela la preparación de nanogrupos de metales nobles asociados con moléculas orgánicas. El término asociación en el presente documento significa cualquier forma de unión, independientemente de la naturaleza química o física de la unión (por lo tanto, por ejemplo, unión covalente, no covalente, electrostática o de van der Waals). Se hace referencia al documento WO 2004/003558 A1 con respecto a la preparación de los nanogrupos como núcleo de las nanopartículas de la invención.

Las nanopartículas de uso preferente de acuerdo con la invención tienen una capa de pasivación que aumenta la intensidad de la fluorescencia y mejora la estabilidad química y física del núcleo inorgánico. Como resultado, las nanopartículas emiten luz preferentemente con un rendimiento cuántico de más del 10 %, preferentemente de más del 50 %.

Dichas nanopartículas tienen, preferentemente, una estabilidad al almacenamiento de al menos 12 meses en un entorno acuoso a 4 °C y son, si es posible, estables a través de un intervalo de pH 5 a pH 10, preferentemente de pH 7 a pH 10, es decir, presentan desviaciones de menos del 50 % con respecto a sus características espectrales específicas, tales como el rendimiento cuántico, la posición de la emisión máxima, la mitad del ancho del espectro de emisión. Las partículas preferentes presentan desviaciones de menos del 10 % con respecto a estas características espectrales específicas.

Las nanopartículas utilizables de acuerdo con otra realización de la invención exhiben esencialmente una constancia/estabilidad de las propiedades del núcleo (incluyendo la capa de pasivación que lo rodea) también en condiciones biológicas (es decir, fisiológicas) o *in vivo* durante un período de al menos tres días. Las partículas preferidas presentan una constancia/estabilidad de este tipo durante un período de 7 a 14 días, en el que por medio de la estabilidad se conserva al menos el 50 % de la constancia de las propiedades. Esta información se refiere especialmente a la estabilidad de las nanopartículas en el órgano diana real. Cabe destacar que la estabilidad de las nanopartículas en los órganos que tienen función principalmente catabólica puede ser claramente menos estable (por ejemplo en el hígado). Esto puede incluso ser expresamente deseable.

Aunque las nanopartículas son estables en el sentido anterior, son sin embargo fundamentalmente degradables *in vivo* y, por consiguiente, no son inertes. En este sentido, "no inerte" significa que al menos el 50 % de las nanopartículas ya se han degradado después de 12 semanas o más después de la administración. Se prefiere que al menos el 50 % de la degradación sea detectable ya después de 8, 6 u 4 semanas. La detección de las partículas que quedan en el cuerpo incluye la detección en órganos del cuerpo y en el plasma para este fin. Por consiguiente, "inerte" significa que más del 50 %, incluso hasta casi el 100 %, de las partículas todavía son detectables en el cuerpo del paciente después de 4 semanas desde la administración.

La degradabilidad de las nanopartículas puede detectarse mediante ensayos que son conocidos por el experto en la materia, a saber, por ejemplo, por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), cuyos ensayos también pueden complementarse con mediciones de espectrometría de fluorescencia, si las muestras son adecuadas.

La capa de pasivación contiene al menos un componente imidazol. Dicho compuesto es capaz de coordinar átomos metálicos o iones metálicos, por ejemplo iones de cinc, iones de mercurio o iones de cadmio. En una realización preferente, el grupo imidazol está en una posición terminal según la estructura de la molécula. La capa de pasivación puede tener además un reticulante, o el componente imidazol cíclico o lineal también puede actuar como un reticulante. El reticulante puede ser alcalino.

Los compuestos de coordinación que contienen átomos metálicos o iones metálicos pueden unirse funcionalmente a núcleos inorgánicos fluorescentes por medio de propiedades de quelación, coordinación o donación de electrones de las bases de Lewis y tienen restos/grupos conjugados de forma correspondiente. Dichas moléculas pueden además contener restos que imparten solubilidad o humectabilidad a los núcleos recubiertos con ellos en soluciones acuosas.

El componente de imidazol está adecuadamente reticulado por un compuesto de fosfina, siendo, preferentemente, un compuesto de alquifosfina.

El término "componente imidazol" significa, a los efectos de la presente descripción, una molécula heterocíclica o heteroaromática que contiene al menos un grupo imidazol (incluyendo derivados de imidazol) y que está disponible para la unión del núcleo inorgánico o la capa de pasivación que tiene un metal tal como cadmio, cinc, galio o un catión metálico o un sustrato que contiene dicho catión. A este respecto, preferentemente, el grupo imidazol está en una posición terminal según la estructura de la molécula. El componente imidazol en su forma funcional se une a través del anillo que contiene orbitales moleculares deslocalizados al nanocrystal fluorescente. Normalmente, los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol sirven como ligandos de coordinación para unirse funcionalmente a un ion metálico tal como cadmio o cinc.

En una realización, el componente imidazol comprende grupos funcionales reactivos tales como uno o dos aminoácidos, por ejemplo histidina, carnosina, anserina, baleína, homocarnosina, histidilfenilalanina, ciclo-histidilfenilalanina, 5-amino-4-imidazol-carboxamida, histidilleucina, 2-mercaptoimidazol, boc-histidina, hidrazida, histinol, 1-metilhistidina, 3-metilhistidina, imidazolisina, ornitina que contiene imidazol (por ejemplo, 5-metilimidazol), alanina que contiene imidazol (por ejemplo, (beta)-(2-imidazolil)-L-(alfa)alanina), carzinina, histamina. Estas moléculas basadas en histidina o aminoácidos que contienen imidazol pueden sintetizarse mediante procedimientos generalmente conocidos.

El término "fosfina" significa, para los fines de la invención, una molécula que tiene al menos un grupo fosfina (incluyendo sus derivados) para unir o quelar un no metal, tal como Se, S u otros no metales o sustratos que contienen tales átomos y que proporciona al menos un grupo funcional (por ejemplo hidroxilo-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida-, etc.) para la reacción con moléculas vecinas.

En una realización preferente de la invención, el componente imidazol es un péptido que comprende al menos un residuo histidilo y, preferentemente, un dipéptido que contiene uno o dos residuos His.

En una realización preferente adicional, el componente imidazol es una mezcla de diferentes dipéptidos que contienen histidilo.

Preferentemente, al menos un grupo fosfina debe situarse en una posición terminal basada en la estructura de la molécula. Los restos de fosfina sirven como ligandos de coordinación para unirse en su forma funcional con un núcleo fluorescente o un compuesto de la capa de protección un no metal o ion tal como Se o S.

En una realización preferente, el compuesto que contiene fosfina incluye uno, dos o más grupos fosfina acoplados entre sí (por ejemplo, en forma polimérica) que pueden incluir compuestos de hidroximetilfosfina o similares, pero sin estar limitados a los mismos. Los compuestos que contienen fosfina pueden sintetizarse por procedimientos generalmente conocidos. Adicionalmente, se sabe que los compuestos que contienen alquifosfina tienen también posiblemente uno o más grupos funcionales adicionales (por ejemplo, hidroxilo-, amino-, tiol-, carboxil-, carboxamida-, etc.). Ejemplos de derivados son derivados, amidas o ésteres de hidroximetilfosfina, siempre y cuando dicha derivatización sea compatible con las funciones descritas en el presente documento de fosfina como recubrimiento.

Se da preferencia particular a la tris(hidroximetil)fosfina y al ácido β -[tris(hidroximetil)fosfino]propanoico para recubrir los núcleos inorgánicos fluorescentes de las nanopartículas de la invención. Los compuestos que contienen fosfina reticulada son bien conocidos por ser además capaces de unirse funcionalmente a átomos y/o iones metálicos, tales como Zn o Cd. Los isocianatos o alquilcianoacrilatos funcionalizados a este respecto pueden ser además útiles como reticulantes para ligandos y la formación de aductos con núcleos fluorescentes. Dichos reticulantes pueden ser también básicos.

El efecto de pasivación de la capa de pasivación presente de acuerdo con la invención se basa en la protección de átomos de cadmio o de cinc de superficie o similares mediante la formación de complejos con el componente imidazol y sobre la protección de los contraátomos (Se o S o similares) mediante la formación de complejos con los compuestos que contienen fosfina.

La capa de pasivación de las nanopartículas de la invención se ha desvelado en el documento US 2004/0247861 A1. Esta solicitud abierta a inspección pública describe la preparación de núcleos inorgánicos recubiertos con la capa de pasivación, por ejemplo de puntos cuánticos. Por lo tanto, se hace referencia al documento US 2004/0247861 A1 que enseña la preparación de la capa de pasivación empleada de acuerdo con la invención y de los núcleos inorgánicos recubiertos con la misma.

Las moléculas de la capa de pasivación pueden además tener o llevar grupos químicos con el fin de unirse y reticular moléculas y células diana (ligandos específicos). En presencia de reactivos apropiadamente adecuados tales como $ZnSO_4$ y Na_2S , dichas moléculas o compuestos pueden formar una capa de pasivación con las moléculas en el núcleo fluorescente ("protector" o "envoltura"). Estos reactivos también pueden unirse funcionalmente a átomos o iones sobre la superficie del nanocrystal fluorescente y, como resultado, esta capa de pasivación adicional también puede estar formada directamente sobre la superficie del núcleo.

- 5 En una realización ventajosa, las nanopartículas de la invención pueden tener adicionalmente modificadores que pueden consistir en restos orgánicos y/o inorgánicos. Se utilizan para mejorar la compatibilidad, la eficacia y/o la solubilidad de las nanopartículas en un medio líquido o de suspensión, en particular en el entorno fisiológico. Esta modificación de la superficie es especialmente ventajosa para conseguir una adsorción inespecífica muy baja y una compatibilidad aumentada en sistemas biológicos, en particular en el cuerpo humano.
- 10 Una posibilidad es modificar la superficie con polietilenglicol (PEG) que ya se ha aprobado para aplicaciones médicas particulares, en particular en formas de bajo peso molecular para la nanopartícula para mantener un tamaño global pequeño. De esta manera, tanto la biocompatibilidad como el tiempo de circulación en sangre de las nanopartículas y también la eficiencia de captación en las células pueden aumentarse. La combinación de una capa de PEG de bajo peso molecular con otras sustancias, tales como vitaminas, por ejemplo ácido fólico, puede conseguir una captación menor de dichas nanopartículas en macrófagos debido a que la adsorción de proteínas a las nanopartículas, que está reducida de este modo, dificulta el reconocimiento de dichas nanopartículas por el sistema inmunológico.
- 15 Otra posible modificación ventajosa de la superficie mediante el uso de modificadores es el recubrimiento con monosacáridos, disacáridos o trisacáridos hasta polisacáridos de bajo peso molecular compuestos por un tipo de monosacárido o monosacáridos diferentes. Un posible tipo de desarrollo es una modificación con poliglucosa, por ejemplo, en el que se puede usar dextrano que se ha demostrado médicamente que es un sustituto de la sangre. Presenta buena biocompatibilidad/tolerancia. Otra realización es el uso de formas estereoisoméricas (D-/L-) de sacáridos con el fin de contrarrestar una posible degradación.
- 20 Otra realización es el uso de vitaminas hidrófilas biológicamente compatibles como modificadores, por ejemplo tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cobalamina, ácido pantoténico, ácido ascórbico y ácido fólico. De este modo, por ejemplo, el ácido fólico puede conducir a una unión preferida de nanopartículas a las células cancerosas. Esta vitamina exhibe inmunogenicidad tan solo baja y, por lo tanto, una biocompatibilidad alta. La internalización de las nanopartículas se facilita mediante la unión al receptor de ácido fólico unido a la membrana.
- 25 Las modificaciones de la superficie también son posibles con vitaminas lipofílicas, tales como retinol, colecalfiferol, tocoferol y filoquinona. De este modo, por ejemplo, la vitamina E puede aumentar la captación celular de nanopartículas.
- 30 Los ácidos grasos tales como, por ejemplo, 1-octadeceno o ácido 18-metileicosanoico y sus derivados, pueden aumentar la solubilidad y la estabilidad de los coloides y tienen un grupo carboxilo terminal funcional que puede utilizarse para la unión posterior de ligandos específicos. Por lo tanto, es útil incluir ácidos grasos como modificadores.
- 35 Otra realización de la modificación de la superficie es un recubrimiento con polialcoholes tales como, por ejemplo, dietilenglicol (DEG), que son particularmente buenos para reducir la adsorción inespecífica de proteínas. Lo mismo se aplica al politetrafluoroetileno (PTFE, Teflon™), en particular en sus formas de bajo peso molecular, que pueden conseguir una adsorción de proteínas reducida. El politetrafluoroetileno se utiliza con frecuencia en aplicaciones cardioquirúrgicas.
- 40 Asimismo, pueden realizarse modificaciones de la superficie usando uno o más aminoácidos naturales que incluyen aminoácidos tanto proteínogénicos como no proteínogénicos y aminoácidos sintéticos. En el presente documento pueden usarse ambos estereoisómeros (formas D y L). Los dipolipéptidos, tripolipéptidos, tetrapolipéptidos y superiores de los aminoácidos mencionados anteriormente apenas estimulan el sistema inmunológico y, por tanto, también son adecuados para una capa de compatibilidad fina. Pueden ser secuencias de aminoácidos artificiales así como secuencias de proteínas biológicas. También se pueden usar derivados peptídicos de proteínas naturales, tales como, por ejemplo, fitoquelatina, para la modificación de la superficie. La modificación de la superficie con péptidos Tat y péptidos que contienen péptidos Tat es otra posibilidad para hacer disponibles las nanopartículas para el uso en aplicaciones biomédicas. El péptido Tat es una molécula eficaz, por ejemplo, para suministrar nanopartículas de oro a través de la membrana celular hasta el núcleo.
- 45 Otra realización de posibles modificadores es la formación de un recubrimiento de fosforilcolina. La fosforilcolina reduce una posible adsorción inespecífica de proteínas, por ejemplo en lentes de contacto. Debido a sus propiedades no trombogénicas, una modificación de fosforilcolina puede emplearse fácilmente en sistemas biológicos y se distingue por una alta estabilidad durante el almacenamiento.
- 50 Dado que el polilactato es biocompatible, esta sustancia se utiliza en diversas aplicaciones médicas. Más específicamente, las formas de bajo peso molecular de polilactato constituyen otra posible modificación de la superficie de las nanopartículas de la invención. En el presente documento se pueden usar ambos estereoisómeros (formas D-/L) con el fin de reducir la posible biodegradación.
- 55 Aparte de las modificaciones de la superficie mencionadas, también es posible la unión proteolíticamente escindible de proteínas inespecíficas a las nanopartículas. Esto puede aumentar la biocompatibilidad/compatibilidad. En la localización diana, la proteína grande puede eliminarse liberando las nanopartículas pequeñas al tejido. Dicha eliminación también puede tener lugar después de un tiempo de permanencia apropiado. Para esto normalmente se

usan proteínas preferentes, tales como, por ejemplo, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, elastina y albúmina, además de otras proteínas que reducen la adsorción inespecífica. De este modo, por ejemplo, el recubrimiento de superficie compuesto por combinaciones de polipéptidos con elastina puede evitar la formación de coágulos no deseada y, por lo tanto, aumentar la biocompatibilidad de las nanopartículas.

- 5 La proteína seroalbúmina mayoritaria puede reducir las interacciones no específicas con las membranas plasmáticas. Adicionalmente, la nanopartícula modificada apropiadamente retiene la capacidad para desarrollar interacciones específicas con las células diana mediante un ligando específico que se une simultáneamente a la superficie de la partícula. Un recubrimiento con seroalbúmina puede dar como resultado un tiempo en la circulación sanguínea sustancialmente más largo al impedir una absorción por los microfagos después de la administración intravenosa más rápida que en el caso de las nanopartículas no recubiertas.

10 La combinación de diámetro hidrodinámico reducido que da como resultado las velocidades de difusión y perfusión más altas mencionadas, junto con las propiedades y mejoras descritas anteriormente y la alta intensidad de fluorescencia, especialmente en el intervalo de luz roja visible, hace que las nanopartículas de la invención sean un simple agente de diagnóstico que puede emplearse de muchas maneras diferentes para la discriminación selectiva y precisa de las formas tisulares *in vivo*. Estas posibilidades, en combinación con biomarcadores específicos de antígenos, se usan especialmente para identificar células que expresan CD44v5, CEA y/o CA19-9, en particular para distinguir tejido anormal (pre)carcinogénico del tejido normal, de modo que se ayuda a la evaluación visual durante la intervención quirúrgica para una resección tumoral más precisa.

15 Las nanopartículas de la invención que se pueden usar en el presente documento sirven, por tanto, como agentes de contraste. Esto se aplica en particular al uso en el diagnóstico y la cirugía del cáncer.

20 Las nanopartículas que portan la proteína de unión a CD44ex9 de acuerdo con la invención pueden emplearse como agente de diagnóstico, agente terapéutico y/o agente terapéutico *in vitro*, además de *ex vivo* o *in vivo*. A tal fin, pueden administrarse localmente (por ejemplo, por vía intratumoral, intramuscular o en tejidos/órganos accesibles quirúrgicamente) o bien también sistémicamente (por ejemplo, por vía intravenosa). La administración local/tópica puede proporcionarse por medio de una solución líquida, de pulverización, espuma, crema o parche activo. Esto puede ser preferente en particular para el tratamiento/diagnóstico de órganos huecos, tal como en el caso del cáncer de intestino. También es posible la ingesta oral, por ejemplo como jarabe o en forma de comprimidos o cápsulas. La inhalación es igualmente posible (por ejemplo, pulverización). Se prevé la administración anal mediante supositorio. En una variante, las nanopartículas pueden implantarse en forma de depósito.

25 En una realización preferente de la invención, la proteína de unión a CD44ex9 se puede usar para la administración dirigida de fármacos. En el contexto de la presente invención, la administración dirigida de fármacos se define como una medida para concentrar la medicación en los tejidos de interés mientras se reduce la concentración relativa de la medicación en los tejidos restantes. A tal fin, la proteína de unión a CD44ex9 conjugada a una nanopartícula está unida a un vehículo de administración de fármaco. Existen numerosos tipos de vehículos de administración de fármacos que son conocidos por el experto en la técnica y que este puede seleccionar de acuerdo con el fin específico, tal como, por ejemplo, micelas poliméricas, liposomas, portadores de fármacos basados en lipoproteínas, portadores de fármacos en nanopartículas, dendrímeros, etc. Un vehículo de administración de fármacos ideal debe ser no tóxico, biocompatible, no inmunogénico, biodegradable y que evite el reconocimiento por los mecanismos de defensa del huésped.

30 En una realización preferente de la invención, los liposomas que comprenden ácidos bisfosfónicos derivados de lípidos se pueden usar para la administración dirigida de fármacos, especialmente para administrar en estructuras óseas. Los ácidos bisfosfónicos derivados de lípidos respectivos se describen en el documento WO 2005/070952 A2 (MCS Micro Carrier Systems GmbH) junto con procedimientos de preparación y utilización de dichos ácidos bisfosfónicos.

35 En una realización preferente de la invención, la nanopartícula conjugada de la invención puede usarse como agente de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro*. El uso diagnóstico *in vitro* o *ex vivo* se refiere a la detección de la proteína CD44v5 en una muestra derivada de un paciente. La muestra que se va a analizar puede ser de cualquier tipo, incluyendo tejidos, órganos y biopsias de los mismos o fluidos corporales tales como sangre, suero, orina, saliva o líquido cerebral.

40 Para el uso diagnóstico, la nanopartícula conjugada está marcada para su detección. Los marcadores adecuados se conocen de la técnica anterior e incluyen colorantes tales como colorantes luminiscentes o fluorescentes, un isótopo radiactivo, una enzima, un marcador proteico, tal como un marcador FLAG, un marcador GST, un marcador-MBP o marcador-His o una nanopartícula.

45 Para la incorporación de un marcador se conocen varios procedimientos de la técnica anterior que se basan en la modificación aleatoria de grupos sulfhidrilo, amina o carboxilo. Como alternativa, se puede usar ingeniería genética para introducir o eliminar grupos reactivos adicionales, tales como un residuo de cisteína.

50 Como procedimiento alternativo, se puede unir un marcador peptídico corto a la proteína que funciona como un sitio aceptor del marcador. En el presente documento, el marcador está unido a través de una actividad intrínseca del

5 marcador o la actividad de una enzima suministrada en trans. Ejemplos de dicho marcaje asociado a la actividad incluyen biotilación específica del sitio, mediada por la holoenzima sintetasa BirA de biotina, que permite combinar proteínas marcadas con una amplia gama de reactivos de avidina/estreptavidina. Las proteínas fusionadas al marcador LUMIO (un hexapéptido que contiene un motivo de tetracisteína) pueden teñirse directamente con colorantes que contienen dos átomos de arsénico.

10 En una realización preferente de la invención, la versión modificada por ingeniería genética de la enzima de reparación del ADN humano O(6)-alquilguanina ADN alquiltransferasa (AGT; también conocida como SNAP-Tag) se fusiona a la proteína de unión a CD44ex. Los sustratos que contienen O(6)-bencilguanina se unen covalentemente a las proteínas de fusión a través de un enlace tioéter estable en una reacción rápida y altamente específica de automarcaje. Esta técnica del marcador y su uso con fines de diagnóstico la desvelan Kampmeier y col., (2009) y Xie y col., (2010) junto con procedimientos de preparación y utilización de dichos marcadores.

De acuerdo con la invención, la proteína de unión a CD44ex9 está unida a una nanopartícula. Se conocen diversos tipos de nanopartículas en la técnica anterior y también se desvelan en la presente solicitud.

15 En una realización preferente adicional, la proteína de unión a CD44ex9 marcada, que está unida a una nanopartícula, está contenida dentro de un baño de inmersión acuoso. Sumergiendo la muestra en el baño de inmersión, la proteína de unión a CD44ex9 marcada marcará específicamente las proteínas CD44v5 de la muestra que el investigador puede evaluar directamente visualmente. Este procedimiento es especialmente adecuado para cirugía, por lo que el tejido retirado puede analizarse durante la cirugía para detectar la presencia de marcadores tumorales. Como resultado, el cirujano dispone de información inmediata con respecto a la precisión de la resección del tumor.

El término agente de diagnóstico se utiliza en el contexto de la presente invención como sinónimo de "agente de contraste", es decir, sirve para la visualización discriminatoria de estructuras morfológicas o funcionales en sistemas biológicos, especialmente en personas vivas, para ayudar a una intervención médica.

25 Las nanopartículas se pueden emplear como agente de diagnóstico, especialmente en intervenciones quirúrgicas. También pueden usarse en procedimientos mínimamente invasivos (por ejemplo, endoscopia, laparoscopia). La combinación con procedimientos de obtención de imágenes, tales como PET, MRT, CT, etc. merece la pena.

30 Como ya se ha indicado anteriormente, el uso de acuerdo con la invención en forma de administración local es particularmente ventajoso. La cantidad de Cd empleado en la administración local a este respecto de forma ventajosa no excede de una décima parte de la exposición total que normalmente se acumula de todos modos durante el curso de la vida en el hígado y el riñón de una persona de edad avanzada y estilo de vida habitual. La exposición total de estos órganos es de aproximadamente 18 mg. Por consiguiente, es ventajoso para la administración local que la cantidad de nanopartículas esté limitada de modo que la cantidad de Cd suministrada al menos no supere sustancialmente 2 mg. En una realización particularmente preferente, la visualización del tumor es posible incluso con una cantidad de agente de contraste que no exceda una cantidad total de 0,6 mg, particularmente preferentemente 0,2 mg, de cadmio.

40 Por "administración local" se entiende, para el fin de la invención, cualquier administración, en la que se pueda esperar una cantidad o dosis aumentada del agente de contraste en regiones distintas del cuerpo, dependiendo de la forma de administración. Por consiguiente, una administración vascular del agente de contraste es también una administración local, si las medidas de acompañamiento del personal encargado de la administración, tal como, por ejemplo, aplicar una ligadura a vasos aferentes o eferentes, impiden la diseminación del agente de contraste a través del sistema vascular sanguíneo en el cuerpo de una manera esencialmente sin dificultades.

45 La ventaja particular de esta realización es que el uso de las nanopartículas en la aplicación médica sobre una persona viva es, por lo tanto, posible porque, de otro modo, es decir, como administración sistémica, está excluido debido a la toxicidad asociada con la misma. Esto se debe a que la administración local reduce la dosis de nanopartículas necesaria para una visualización adecuada.

50 Se ha observado que el agente de contraste que contiene Cd se emplea ventajosamente de acuerdo con la invención para visualizar un tumor in vivo a una dosis correspondiente a una cantidad de 0,002 a 0,02 mg de Cd por cm^3 del tejido tumoral. Las dosis del agente de contraste de 0,002 a 0,015 mg de Cd/ cm^3 de tejido tumoral son particularmente ventajosas, en particular las comprendidas entre 0,002 y 0,010 mg de Cd/ cm^3 . Es posible con esta dosificación ventajosa visualizar tumores con un volumen de hasta aproximadamente 150 cm^3 in vivo sin exceder por ello el límite superior de exposición normalmente aceptable para los seres humanos. La visualización de tumores con un volumen de hasta 50 cm^3 es particularmente favorable.

55 Las investigaciones pueden referirse a todos los tejidos/órganos accesibles del paciente, especialmente en la piel, órganos huecos (por ejemplo, en los tractos gastrointestinal, urogenital, respiratorio) o bien regiones accesibles desde fuera de los órganos sensoriales y también al sistema cardiovascular.

También es posible el uso como agente de diagnóstico *in vitro*, por ejemplo inmunohistoquímica o FACS, y ELISA. Una combinación de diagnóstico *in vivo* e *in vitro* (por ejemplo, material de biopsia) es particularmente ventajosa.

ES 2 639 855 T3

Las proteínas de unión a CD44ex9 de acuerdo con la invención pueden permanecer unidas a las nanopartículas o pueden eliminarse o detectarse o liberarse.

En un aspecto adicional, la solicitud desvela péptidos v5 de CD44 como se enumeran en la siguiente tabla y se designan como SEQ ID No. 11 a 38. Estos péptidos tienen 12 unidades con secuencias superpuestas que cubren el dominio v5 completo del CD44 humano.

5

N.º de péptido de CD44v5	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No.
1	DVDRNGTTAYEG	11
2	VDRNGTTAYEGN	12
3	DRNGTTAYEGNW	13
4	RNGTTAYEGNWN	14
5	NGTTAYEGNWNP	15
6	GTTAYEGNWNPE	16
7	TTAYEGNWNPEA	17
8	TAYEGNWNPEAH	18
9	AYEGNWNPEAHP	19
10	YEGNWNPEAHPP	20
11	EGNWNPEAHPLL	21
12	GNWNPEAHPLLI	22
13	NWNPEAHPLLIH	23
14	WNPEAHPLLIHH	24
15	NPEAHPLLIHHE	25
16	PEAHPLLIHHEH	26
17	EAHPPLIHHEHH	27
18	AHPPLIHHEHHE	28
19	HPPLIHHEHHEE	29
20	PPLIHHEHHEEE	30
21	PLIHHEHHEEEE	31
22	LIHHEHHEEEET	32
23	IHHEHHEEEETP	33
24	HHEHHEEEETPH	34

(continuación)

N.º de péptido de CD44v5	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No.
25	HEHHEEEETPHS	35
26	EHHEEEETPHST	36
27	HHEEEETPHSTS	37
28	HEEEETPHSTST	38

En un aspecto, la solicitud desvela un péptido designado como SEQ ID No. 11 a 38 que tiene una delección en N-terminal y/o C-terminal de uno, dos o tres aminoácidos.

5 En otro aspecto, la solicitud desvela también un péptido designado como SEQ ID No. 11 a 38 que tiene una extensión en N-terminal y/o C-terminal de uno, dos o tres aminoácidos, por lo que estos aminoácidos adicionales son los de la respectiva secuencia de aminoácidos CD44v5.

En otro aspecto, dicho péptido puede usarse para bloquear la nanopartícula conjugada de la invención. Debido a esta actividad antagonista, estos péptidos podrían usarse para verificar la especificidad de un marcaje de CD44 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

10 Adicionalmente, dicho péptido podría usarse como antagonista para el uso terapéutico de la nanopartícula conjugada. En este contexto, el péptido podría usarse para regular, disminuir o cancelar el efecto del tratamiento asociado con CD44ex9.

15 En un entorno terapéutico, los péptidos CD44v5 podrían unirse directamente a los ligandos endógenos del receptor de CD44. Esto podría conducir a la neutralización de estos ligandos (haciendo que no estén disponibles para los receptores de CD44) y también podría conducir a una rápida eliminación por los macrófagos.

En un aspecto adicional, la solicitud desvela que uno o más de estos péptidos de acuerdo con las SEQ ID No. 11 to 38 podrían usarse como una vacuna con el fin de estimular el sistema inmunológico del individuo para desarrollar inmunidad adaptativa contra las variantes de CD44 que expresan el dominio v5. Como una vacuna, dichos péptidos podrían usarse para la prevención del cáncer o para una inmunoterapia del cáncer.

20 Debido al resultado exitoso de la selección de dos híbridos que conduce a la identificación de la proteína de unión a CD44ex9, los péptidos respectivos se han validado como epítopos inmunológicamente relevantes. De este modo, son adecuados para el uso como vacunas.

25 La solicitud también desvela una composición de vacuna que comprende una proteína aislada de acuerdo con las SEQ ID No. 11 a 38 o un fragmento peptídico de la misma o un ácido nucleico que codifica dicha proteína o dicho fragmento peptídico para su uso como medicamento en la prevención o tratamiento de un cáncer.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a CD44ex9 de la invención o una proteína de unión a CD44ex9 marcada, que están unidas a una nanopartícula y a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones farmacéuticas preparadas de acuerdo con la invención comprenden la nanopartícula conjugada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier vehículo que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de la proteína de unión a CD44ex9 y que no es tóxico para el huésped al que se le administra.

35 Como una realización de la invención, las composiciones se preparan usando proteína de unión a CD44ex9 estabilizada con seroalbúmina humana. A tal fin, se liofiliza una preparación de proteína de unión a CD44ex9 con seroalbúmina humana en viales.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más otros fármacos que actúan como toxina, citocina, agente citostático o agente inmunomodulador.

40 Tal como se usa en el presente documento, con la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende incluir todos y cualquier disolvente, solubilizante, carga, estabilizante, aglutinante, absorbente, base, agente tampón, lubricante, vehículo de liberación controlada, diluyente, agente emulsionante, humectante, lubricante, medio de dispersión, recubrimiento, agente antibacteriano o antifúngico, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente

convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar agentes complementarios en las composiciones.

5 Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con la vía de administración que se pretende. Entre los ejemplos de las vías de administración se incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfato sódico; agentes quelantes, tales como EDTA; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El valor de pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple hechos de vidrio o plástico.

15 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Ludwigshafen, BRD) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición inyectable deberá ser estéril y será fluida en la medida en la que se pueda inyectar con facilidad. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario y mediante el uso de tensioactivos.

20 La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorbutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio.

25 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, la nanopartícula conjugada) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferentes de preparación son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente esterilizada mediante filtración.

30 Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina, comprimirse en forma de comprimidos. Con el fin de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo líquido para su uso como colutorio, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente y se mueve y se expectora o se traga. Se pueden incluir como parte de la composición compuestos de unión o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina; un excipiente, tal como almidón o lactosa; un agente disgregante, tal como ácido alginico, glicolato de almidón sódico (por ejemplo, Primogel®), o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio; un emoliente tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.

35 Para la administración por inhalación, los compuestos se liberan en forma de un pulverizador en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

40 La administración sistémica también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración transdérmica o transmucosa, se usan penetrantes adecuados de la barrera que se desea atravesar. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos bioactivos se formulan como ungüentos, pomadas o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

45 La composición también se puede preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los restos terapéuticos, que pueden contener la proteína de unión a CD44ex9, se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente a partir, por ejemplo Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals Incorporation. También pueden usarse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células cancerosas con anticuerpos contra antígenos tumorales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de proteína activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención vienen dictadas y dependen directamente de las características únicas de la proteína activa y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de la proteína pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal al 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Son preferentes los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes. Aunque pueden usarse proteínas que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe llevarse cuidado diseñando un sistema de administración que dirija dichas proteínas al sitio o el tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no cancerosas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos cae preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semimáxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar más precisamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, embalaje o dispensador, junto con instrucciones para la administración.

En otro aspecto, la invención proporciona un embalaje de combinación medicamento/dosímetro que comprende: a) un medicamento que se va a administrar individualmente, y b) un sistema indicador de diagnóstico para una propiedad específica del paciente que es relevante para la acción, efecto secundario, interacción, metabolismo, absorción, distribución, metabolismo y eliminación del medicamento que se va a administrar a un paciente, en el que la propiedad específica del paciente se selecciona de entre el grupo que consiste en una sustancia endógena, un mecanismo de regulación, un gen o un sistema de indicación. En el embalaje de combinación descrito anteriormente, el medicamento o el sistema indicador de diagnóstico puede ser la proteína de unión a CD44ex9 aislada o cualquier proteína de fusión o conjugado con la misma. Para el fin descrito anteriormente, también se pueden usar los péptidos CD44v5 de la invención como medicamento o sistema indicador de diagnóstico.

Un embalaje de combinación adecuado se desvela en el documento EP 1 542 644 B1 (MCS Micro Carrier Systems GmbH), junto con procedimientos de preparación y uso de dicha combinación de medicamento/dosímetro.

Otro aspecto de la invención incluye procedimientos para preparar composiciones farmacéuticas para modular la expresión o actividad de la proteína de la presente invención. Tales procedimientos comprenden la formulación de un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o la actividad de la proteína de la presente invención. Dichas composiciones pueden incluir adicionalmente agentes activos adicionales. De este modo, la invención incluye además procedimientos para preparar una composición farmacéutica formulando un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o la actividad de la proteína de la presente invención y uno o más agentes bioactivos adicionales.

Definiciones

En el contexto de la presente invención, el término "proteína de unión a CD44ex9" se usa para una proteína con una longitud de 300 aminoácidos o menos que se une al polipéptido codificado por el exón 9 del gen CD44 humano. En la descripción se denomina también "proteína de unión" o "compuesto activo".

Una proteína en el contexto de la invención se define como una molécula que está compuesta por aminoácidos. Por lo tanto, el término proteína incluye dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, hexapéptidos, heptapéptidos, octapéptidos, oligopéptidos más largos y cadenas de aminoácidos. La cadena de aminoácidos puede estar en una forma lineal o ramificada.

- 5 Los aminoácidos en el contexto de la presente invención son compuestos orgánicos que contienen al menos un amino y al menos un grupo carboxilo que en la proteína forma un enlace amida.

Los aminoácidos que forman parte de la proteína pueden tomarse de los 20 alfa-aminoácidos estándar o aminoácidos no estándar, como selenocisteína, pirrolisina, lantionina, hidroxiprolina, carboxiguatamato, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina. Adicionalmente, otros aminoácidos como beta-aminoácidos (por ejemplo, beta alanina), gamma aminoácidos o incluso aminoácidos superiores podrían formar parte de la proteína.

10 Para ciertos aminoácidos se puede elegir una forma enantiomérica o estereoisomérica diferente, como, por ejemplo, para los aminoácidos alfa que existen como dos enantiómeros, la forma D y la forma L.

La proteína puede fabricarse sintéticamente (por medio de síntesis orgánica en un sistema sin células que hace uso de un sistema ribosómico que puede o no ser artificial) o puede ser fabricada de forma natural por células que pueden o no manipularse genéticamente, o por un único organismo celular (por ejemplo, por una bacteria o una célula de levadura) o un organismo multicelular.

15 La proteína podría modificarse de muchas maneras. Las modificaciones típicas son modificaciones postraduccionales que incluyen lípidos, grupos acetato, grupos fosfato o carbohidratos. La proteína también podría modificarse químicamente, por ejemplo con biotina.

20 La proteína puede ser un multímero que consiste en subunidades idénticas (homómero) o proteínas diferentes (heterómero) que se mantienen unidas por enlaces covalentes o interacciones no covalentes.

La expresión "afinidad de unión" utilizada en el presente documento se refiere a la fuerza de la afinidad entre la proteína de unión a CD44ex9 y el dominio CD44v5 y se describe mediante la constante de disociación K_D . El valor de la K_D para la afinidad de unión entre la proteína de unión a CD44ex9 y el dominio CD44v5 puede determinarse mediante procedimientos de equilibrio, (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™), por ejemplo.

25 " K_D " se refiere a la afinidad de unión relativa entre la proteína de unión A CD44ex9 y el dominio CD44v5. Los valores de K_D altos representan una eficacia de unión baja.

En el contexto de la invención, la expresión "tratamiento agudo" se refiere a un tratamiento médico a corto plazo, normalmente en un hospital, para pacientes que tienen una enfermedad o lesión aguda o que están en recuperación de una cirugía. La expresión "tratamiento postagudo" se refiere a un tratamiento médico de medio plazo, normalmente en un hospital, para pacientes que tienen una enfermedad o lesión aguda o que están en recuperación de una cirugía.

35 El término "tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier medida médica para prevenir, reducir, mitigar o curar trastornos fisiológicos en un mamífero, en particular un ser humano, en la necesidad del mismo. De acuerdo con la invención, el tratamiento abarca también una administración dirigida de fármacos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como la cantidad de principio activo que reducirá los síntomas asociados con una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, tal como un accidente cerebrovascular. "Terapéuticamente eficaz" también se refiere a cualquier mejora de la gravedad del trastorno o la frecuencia de incidencias en comparación con ningún tratamiento. El término "tratamiento" abarca curar o cicatrizar, así como mitigación, remisión o prevención.

La expresión "vector de expresión" se refiere a vectores que tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. Se conocen muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas y/o están disponibles comercialmente. La selección de vectores de expresión adecuados está dentro del conocimiento del experto en la materia.

En el contexto de la invención, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula con un tamaño inferior a 1 μm y, preferentemente, entre 1 y 100 nm. De este modo, el término "nanopartícula" incluye nanocristales hechos de materiales semiconductores (llamados puntos cuánticos), así como nanopartículas que consisten en un grupo de metales nobles, nanopartículas inorgánicas luminiscentes basadas en tierras raras, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (IONP), micelas de copolímero de bloques, nanocélulas, dendrímeros, nanotubos, polimersomas, nanopartículas XPclad® y nanopartículas que consisten en sílice amorfa rodeada por una capa de fosfato de calcio luminiscente cristalino (por ejemplo, ORMOBEAD®).

Referencias

Dembski S, Probst J, Kockenbring T y Barth S, News Analytik, 18/1/2013; pág. 1,-3.

- Dembski S, Rupp S, Milde M, Gellermann C, Dyrba M, Schweizer S, Batentschuk M, Osvet A, Winnacker A, Optical Materials, 2011, pág.1106-1110. (2011 a)
- Dembski S, Gellermann C, Probst J, Klockenbring T, Barth S, GIT-Labor-Fachzeitschrift 01/2011: 48-49. (2011 b)
- Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA, MAbs, 2009, 1(1): 12-25.
- 5 Goding JW, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (Academic Press, London, 2ª edición, 1986), pág. 61-63.
- Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, L Haubmann L, Manzku S, Wenzel A, Ponta A, Herrlich P: "A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells", Cell 1991,65: 13-24.
- Hale LP y Haynes BF, J Immunol. 1992, 149(12): 3809-3816.
- 10 Jalkanen ST, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. Eur J Immunol. 1986 Oct;16(10):1195-1202.
- Johnson P y Ruffell B, Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(3): 208-220.
- Kampmeier F, Ribbert M, Nachreiner T, Dembski S, Beaufils F, Brecht A y Brecht F, Bioconjugate Chem 2009, 20(5): 1010-1015.
- 15 La Fleur L, Johansson A-C, Roberg K, PLoS ONE 2012, 7(9): e44071
- Nagano O y Saya H, Cancer Sci 2004, 95(12): 930-935.
- Piotrowicz RS, Damaj BB, Hachicha M, Incardona F, Howell SB y Finlayson M, Mol Cancer Ther 2011, 10(11): 2072-2082.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA, Nat Rev Mol Cell Biol. 2003, 4(1): 33-45.
- 20 Probst J, Dembski S, Milde M, Rupp S, Expert Review of Molecular Diagnostics 2012, 12(1): 49-64.
- Seiter BS, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S y Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. J Exp Med, 177: 443-455, 1993.
- Saturag y col., 2000; British Journal of Nutrition; 2000, (84), 791-802
- Singh R y Lillard Jr. JW, Exp Mol Pathol, 2009, 86(3): 215-223.
- 25 Tempfer C, Lösch A, Heinzl H, Häusler G, Hanzal E, Kölbl H, Breitenacker G, Kainz C, Eur J Cancer, 1996, 32A: 2023-2025.
- Vizoso FJ, Fernandez JC, Corte MD, Bongera M, Gava R, Allende MT, Garcia-Muniz JL, Garcia-Moran M, J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 679-686.
- Xie S, Lee S, Chen X, Adv Drug Deliv Rev 2010, 62(11): 1064-1079.
- 30 Zhang S, Wu CC, Fecteau JF, Cui B, Chen L, Zhang L, Wu R, Rassenti L, Lao F, Weigand S, Kipps TJ, Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 6127-6132.

Leyendas de las figuras

- Fig. 1: Estructura genómica y dominios proteicos de CD44.
- 35 Fig. 2: (A) Esquema de la estrategia de la detección de dos híbridos de levadura. (B) Vector usado para la detección de Y2H.
- Fig. 3: Secuencias de aminoácidos de los clones positivos que interaccionan con CD44 junto con la secuencia de consenso derivada del mismo.
- Fig. 4: Marcaje de células HT29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-3.
- Fig. 5: Control negativo para el marcaje de células HT29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-5.
- 40 Fig. 6: Cuantificación del marcaje de células HT29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-3 o el control negativo para la nanopartícula-MBP.
- Fig. 7: Competencia del marcaje de células HT29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-3 mediante la adición de cantidades crecientes del objetivo libre CA19-9.

Fig. 8: Marcaje de células Colo29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-3.

Fig. 9: Control negativo para el marcaje de células Colo29 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-5.

Fig. 10: Marcaje de células SW116 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-3.

Fig. 11: Control negativo para el marcaje de células SW116 con el conjugado de nanopartículas Q_CA19-9-5.

5 Fig. 12: Marcaje de tejido de adenocarcinoma mucinoso (muestra N.º 35) con una nanopartícula biespecifica Q_CEA/CA19-9_12 conjugada con un anticuerpo anti-CEA y un anticuerpo anti-CA-19-9. En los cuatro cuadrantes se analizaron las condiciones siguientes:
 10 Izquierda superior: Marcaje con Q_CEA/CA19-9_12
Derecha superior: Marcaje con CEA/CA19-9_12 mediante la adición de MBP-CEA diana (25 µM)
Izquierda inferior: Marcaje con Q_CEA/CA19-9_12 mediante la adición de la diana libre Sialyl Lewis_a (250 µM)
Derecha inferior: Marcaje con Q_CEA/CA19-9_12 mediante la adición de las dianas libres MBP-CEA (25 µM) y Sialyl Lewis a (250 µM)

Ejemplos

15 Ejemplo 1: Aislamiento de las proteínas de unión a CD44ex9

Para el aislamiento de proteínas o fragmentos de proteínas que se unen al dominio v5 de CD44 se realizó una detección competitiva de dos híbridos de acuerdo con el procedimiento desvelado en el documento EP 1 721 974 A1. Como cebo, se fusionó el fragmento v5 con el dominio de unión a GAL4. El ORF respectivo se clonó en un vector plasmídico y se designó como pGBKT7 (véase la Figura 2). Se usó una biblioteca de ADNc humano con fragmentos fusionados al dominio de activación de GAL4 como presa (vector pGADT7-RecAB; véase la Figura 2).

20 La detección se realizó en condiciones de selección rigurosas y dio lugar a la identificación de 39 clones positivos. Después de la cotransformación selectiva del cebo y del plásmido presa, 21 de los 39 clones permanecieron positivos. Los 21 clones se secuenciaron y se analizaron mediante búsqueda BLAST. Como resultado, las 21 secuencias se pudieron reducir a 12 secuencias diferentes, ya que cuatro secuencias se identificaron dos veces y una secuencia estaba presente en cuatro clones.

Adicionalmente, una comparación de secuencias reveló que estas cinco familias de secuencias muestran amplias homologías de secuencia que permiten la formación de una secuencia de consenso (véase la Figura 3).

Ejemplo 2: Detección *in vitro* de células tumorales que expresan antígenos

2.1 Antecedentes y objeto

30 Con el fin de demostrar la capacidad de los conjugados de puntos cuánticos-proteína para detectar específicamente células tumorales que expresan antígenos, se analizaron muestras tumorales o células tumorales cultivadas *in vitro* mediante fluorescencia y en paralelo mediante inmunohistoquímica para la expresión del antígeno respectivo. Como primer antígeno, se analizó el antígeno carcinoembrionario (CEA). El CEA es una glicoproteína implicada en la adhesión celular. Como ligando de detección, el anticuerpo anti-CEA se conjugó con el punto cuántico QDBP-655 (carga # 773780). Adicionalmente, se analizó el antígeno de cáncer 19-9 (CA19-9). CA19-9 es un antígeno de Lewis (a) sialilado y representa un marcador tumoral que se usa principalmente en el tratamiento del cáncer de páncreas.

2.2. Muestras

2.2.1 Muestras para cultivo celular

40 En un primer conjunto de experimentos, se usaron las líneas celulares de cáncer humanas cultivadas *in vitro* HT29, Colo25 y SW116. HT29 es una línea celular adherente de adenocarcinoma colorrectal, Colo25 una línea celular de carcinoma de colon humano y SW116 una línea celular de cáncer colorrectal.

2.2.2. Muestra de tumor

45 En un conjunto diferente de experimentos, se utilizó una muestra tomada de un tumor humano. La muestra de tumor N.º 35 se resecó en 2011 del ciego y se diagnosticó como un adenocarcinoma mucinoso. Se clasificó según la clasificación TNM como pT4No(0/18)G3Ro. Esta muestra que no se pretrató de otro modo se preparó y fijó como sigue.

Preparación y fijación de secciones de tejido

50 La muestra de tumor resecada, almacenada a -70 °C, se usó para preparar criosecciones con un espesor de 5 µm utilizando un criostato HM560 MV (Thermo Scientific, Walldorf, Alemania). Las secciones se secaron durante de 60 a 120 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con acetona fría (-20 °C) durante 10 minutos. Después de una

etapa de secado adicional durante 10 minutos a temperatura ambiente, las secciones se almacenaron durante la noche a -70 °C.

- 5 Las secciones se descongelaron en una caja cerrada durante 30 minutos a temperatura ambiente. La fijación se realizó mediante incubación en una solución que contenía 20 mg/ml de suberimidato de dimetilo (DMS) y CaCl₂ 20 mM en tampón Tris-HCl 250 mM pH 8,0. Después, las secciones se lavaron durante 5 minutos en tampón D-PBS-T que contenía NaCl 130 mM, Na₂PO₄ 7 mM, KH₂PO₄ 3 mM y 0,1 % de Tween 20 mediante una etapa de inactivación durante 20 minutos en un tampón que contenía NaCl 130 mM, Na₂PO₄ 7 mM, KH₂PO₄ 3 mM y glicerina 200 mM. En una etapa final, las secciones se lavaron durante 5 minutos en tampón D-PBS-T.

Contratinción de las secciones de tejido.

- 10 Se realizó contratinción usando Dako Autostainer Plus (DAKO Deutschland GmbH, Hamburgo, Alemania) de acuerdo con el protocolo siguiente:
- Aclarando con tampón D-PBS-T
 - Bloqueando durante 60 minutos con 1 % de BSA/5 % de suero de cabra en tampón D-PBS
 - Soplando

15 - Incubación con 2 x 100 µl de conjugado (20nM en 1 % de BSA/5 % de suero de cabra en tampón D-PBS) durante 60 minutos

 - Aclarando tres veces con D-PBS-T
 - Soplando

20 - Incubación con 2 x 100 µl de anticuerpo primario (20nM en 1 % de BSA/5 % de suero de cabra en tampón D-PBS) durante 60 minutos

 - Aclarando tres veces con D-PBS-T
 - Soplando

25 - Incubación con 2 x 100 µl de anticuerpo secundario (20nM en 1 % de BSA/5 % de suero de cabra en tampón D-PBS) durante 60 minutos

 - Aclarando tres veces con D-PBS-T
 - Soplando
 - Incubación con 3 x 200 µl Hoechst 33342 (2 µg/ml en tampón D-PBS) durante 10 minutos
 - Aclarando tres veces con D-PBS-T
 - Incluyendo en Mowiol/Trietilendiamina (DABCO)

30 Evaluación microscópica

Las secciones preparadas anteriormente se evaluaron con un microscopio inverso Axiovert 200 con un sistema de cámara CCD AxioCam HrM y AxioCam Hrc, un dispositivo de iluminación HXP 120 C. Las imágenes se analizaron utilizando el software Axiovision (versión 4.8; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

2.3 Conjugados de proteína-punto cuántico

- 35 Para la detección de antígenos se prepararon los puntos cuánticos enumerados en la siguiente tabla:

Conjugado	Tipo de punto cuántico QDBP-655	Ligando	Relación QDBP/Ligando
Q561	n.º 773780	SI6166	N/A
Q_CA19-9-20	n.º 773780	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:50
Q_CEA/CA19-9_9	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:10
Q_CEA/CA19-9_10	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:20
Q_CEA/CA19-9_11	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:30
Q_CEA/CA19-9_12	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:40
Q_CEA/CA19-9_13	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:50
Q_CEA/CA19-9_1	Q561	MBP-NS-19-9-scFv-His ₆ + SI6166	1:50

El conjugado Q561 es un conjugado entre el punto cuántico QDBP-655 (lote # 773780) y el ligando SI6166. QDBP-655 tiene un diámetro hidrodinámico de 6 nm y posee un ligando Ni-NTA. El ligando SI6166 es una proteína de unión a CEA que tiene un diámetro hidrodinámico de 2,1 nm, y el conjugado final exhibe un diámetro hidrodinámico de 10,1 nm. La proteína anti-CEA se acopla a los puntos cuánticos.

Los puntos cuánticos Q_CA19-9-x son conjugados entre el punto cuántico QDBP-655 (lote n.º 773780) y el anticuerpo anti-CA 19-9 "MBP-NS-19-9-scFv-His6". Este anticuerpo anti-CA19-9 que es un mimético de anticuerpo recombinante que consiste en la región variable de la cadena pesada (VH) y la cadena ligera (VL) y puede describirse como un "fragmento de cadena única de regiones variables", scFv. Este fragmento scFv se fusiona con un marcador de His que se usa para el acoplamiento al punto cuántico. El anticuerpo anti-CA 19-9 "MBP-NS-19-9-scFv-His6" también se denomina SI6950.

Los puntos cuánticos Q_CEA/CA19-9_x son conjugados biespecíficos, por lo que el punto cuántico Q561 que aloja el anticuerpo anti-CEA SI6166 se conjuga adicionalmente con el anticuerpo anti-CA 19-9 SI6950.

Se prepararon diferentes lotes del conjugado Q_CEA/CA19-9_x diferenciándose por la relación del punto cuántico respecto al ligando (véase la última columna de la tabla).

3. Resultados de las nanopartículas conjugadas con CA19-9

3.1 Células HT29

Tal y como se muestra en el panel izquierdo superior de la figura 4, el conjugado Q_CA19-9-3 marca la membrana celular de las células HT29. Una tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado por fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho) muestra una co-localización perfecta de las señales que muestran la especificidad de la unión al conjugado. En el panel inferior derecho las células se muestran mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

En el control negativo se usó un punto cuántico conjugado a MBP (MBP-His/QDP655). Como se muestra en el panel superior derecho de la Fig. 5, no se pudo detectar ningún marcaje. La presencia del antígeno CA19-9 se verificó mediante tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado mediante fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho).

El marcaje específico del antígeno CA19-9 también se demostró mediante un experimento de titulación. Como se muestra en la figura 6, una cantidad creciente del conjugado Q_CA19-9_3 conduce a un marcaje aumentado de las células HT29 como se demuestra mediante el aumento de la fluorescencia relativa. Por el contrario, el control negativo MBP-His/QDP655 conduce solamente a un marcaje fluorescente escaso que no muestra un aumento mayoritario a concentraciones de conjugado más altas.

La especificidad del marcaje de CA19-9 se verificó adicionalmente mediante un experimento de competición como se muestra en la Figura 7: Una cantidad creciente de antígeno CA19-9 libre añadido a la mezcla de marcaje conduce a una disminución del marcaje de CA19-9.

3.2 Células Colo29

Tal y como se muestra en el panel superior izquierdo de la figura 8, el conjugado Q_CA19-9-3 marca la membrana celular de las células Colo29. Una tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado por fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho) muestra una co-localización perfecta de las señales que muestran la especificidad de la unión al conjugado. En el panel inferior derecho las células se muestran mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

En el control negativo se usó un punto cuántico conjugado a MBP (MBP-His/QDP655). Como se muestra en el panel superior derecho de la Fig. 9, no se pudo detectar ningún marcaje. La presencia del antígeno CA19-9 se verificó mediante tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado mediante fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho).

3.3 Células SW116

Tal y como se muestra en el panel superior izquierdo de la figura 10, el conjugado Q_CA19-9-3 marca la membrana celular de las células Colo29. Una tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado por fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho) muestra una co-localización perfecta de las señales que muestran la especificidad de la unión al conjugado. En el panel inferior derecho las células se muestran mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC).

En el control negativo se usó un punto cuántico conjugado a MBP (MBP-His/QDP655). Como se muestra en el panel superior izquierdo de la Fig. 11, no se pudo detectar ningún marcaje. La presencia del antígeno CA19-9 se verificó mediante tinción de las células con el anticuerpo anti-CA19-9 detectado mediante fluorescencia con Alexa Fluor 488 (panel superior derecho).

4. Resultados de las nanopartículas conjugadas biespecíficas

Este experimento se realizó con el fin de probar la capacidad de la nanopartícula conjugada biespecífica para interactuar con ambos antígenos en una diana dada. Con este fin se utilizó la nanopartícula conjugada tanto con el anticuerpo anti-CA19-9 como con el anticuerpo anti CEA para detectar los antígenos respectivos en las células

tumorales de la muestra N.º 35 descrita anteriormente. La especificidad se demostró mediante la inhibición con las dianas libres MBP-CEA y 19-9.

5 Como se muestra en el panel superior izquierdo de la Fig. 12, las nanopartículas biespecíficas marcaron las membranas celulares del tejido tumoral. Una tinción del tejido tumoral con un anticuerpo anti-CA19-9 o un anticuerpo anti-CEA mostró en cada caso una co-localización parcial que combina con el perfil de marcaje completo de la nanopartícula,

10 Cuando se utiliza la nanopartícula biespecífica en combinación con la diana libre MBP-CEA, puede observarse un marcaje que muestra una co-localización perfecta con la tinción del anticuerpo anti-CA-19-9 (véase la Figura 12, cuadrante superior derecho). De este modo, la diana libre inhibe la interacción con el CEA unido a las células, pero todavía permite un marcaje del CA19-9.

Como se muestra en el cuadrante inferior izquierdo de la Fig. 12, la adición de la diana libre Sialil-Lewis_a inhibe la interacción con el antígeno CA19-9 celular pero retiene el marcaje CEA.

15 En un experimento final, las nanopartículas biespecíficas se combinaron con ambas dianas libres, MBP-CEA y Sialyl-Lewis_a (véase el cuadrante inferior derecho de la figura 12). Como resultado, el marcaje se inhibió completamente (esquina superior izquierda del cuadrante). La expresión co-localizada de ambos antígenos se verificó mediante tinción con los respectivos anticuerpos anti-CEA y CA19-9.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula conjugada a una proteína capaz de unirse a un polipéptido codificado por el exón 9 de CD44 humano (CD44ex9), dicha proteína comprende o consiste en
- 5 (i) una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID No. 1 to 5; o
(ii) una secuencia de aminoácidos con al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos dada en las SEQ ID No. 1 a 5 en su conjunto,
- en el que dicha proteína tiene una longitud de 100 aminoácidos o menor.
2. La nanopartícula conjugada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína de unión a CD44ex9 se une a una isoforma de CD44 que comprende el dominio codificado por el exón 9.
- 10 3. La nanopartícula conjugada de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la isoforma de CD44 se selecciona entre el enumerado que consiste en:
- 15 a) CD44 v5,
b) CD44 v5-v6,
c) CD44 v3-v6,
d) CD44 v3-v6,
e) CD44 v2-v10,
f) CD44 v3-v10,
g) CD44 v4-v7,
h) CD44 v4-v10.
- 20 4. La nanopartícula conjugada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, conjugada además a al menos una sustancia de unión al antígeno tumoral y/o agente citotóxico.
5. La nanopartícula conjugada de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha sustancia de unión al antígeno tumoral se selecciona de la lista que consiste en un anticuerpo contra CEA, un anticuerpo contra CA-19-9, una adhesina, que está modificada preferentemente y combinaciones de los mismos.
- 25 6. La nanopartícula conjugada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que la nanopartícula se selecciona del grupo que consiste en puntos cuánticos, grupos de metales nobles, nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (IONP), micelas de copolímero de bloques, nanocélulas, dendrímeros, nanotubos, polimersomas, nanopartículas XPclad®, nanopartículas que consisten en sílice amorfa rodeada por una capa de fosfato de calcio luminiscente cristalino, nanopartículas con núcleo-envoltura de $\text{SiO}_2/\text{Zn}_2\text{SiO}_4:\text{Mn}^{2+}$ y $\text{SiO}_2/\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}:\text{Eu}^{3+}$ con diámetros inferiores a 100 nm y nanopartículas híbridas marcadas con colorante luminiscente.
- 30 7. La nanopartícula conjugada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en la que la nanopartícula tiene un núcleo inorgánico y una capa de recubrimiento que comprende un componente imidazol, siendo el diámetro más pequeño del núcleo inorgánico que incluye la capa de recubrimiento de no más de 15 nm.
- 35 8. La nanopartícula conjugada de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el componente imidazol es un péptido que comprende al menos un residuo histidilo y, preferentemente, un dipéptido.
9. La nanopartícula conjugada de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el componente imidazol es una mezcla de diferentes dipéptidos que contienen histidilo.
- 40 10. La nanopartícula conjugada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la nanopartícula es no-inerte.
11. La nanopartícula conjugada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para el uso en el diagnóstico o tratamiento *in vivo* de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, tales como diabetes dependiente de insulina, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedades de la piel, como psoriasis o dermatitis atópica; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal; lesión en los tejidos; enfermedades alérgicas y cáncer.
- 45 12. La nanopartícula conjugada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, para el uso *in vivo* para distinguir tejido anormal, precancerogénico o tejido cancerogénico del tejido normal o para ayudar en la evaluación visual durante la intervención quirúrgica.
- 50 13. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el agente de contraste es capaz de identificar células cancerosas o células de carcinoma *in situ*.
14. La nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 13, en la que las células cancerosas a identificar se

seleccionan de la lista que consiste en:

- 5
- a) células de adenocarcinoma;
 - b) células de tumores epiteliales del timo;
 - c) células de carcinoma del cuello uterino;
 - d) células de linfoma no Hodgkin;
 - e) células de carcinoma de células pulmonares;
 - f) células de carcinoma de páncreas; y
 - g) células madre de cáncer.

10 15. El uso de la nanopartícula conjugada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como un agente de diagnóstico *ex vivo* o *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, tales como diabetes dependiente de insulina, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedades de la piel, como psoriasis o dermatitis atópica; enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal; lesión en los tejidos; enfermedades alérgicas y cáncer.

15 16. Una composición farmacéutica, que comprende la nanopartícula conjugada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. Un embalaje de combinación de medicamento/dosímetro que comprende:

- 20
- a) un medicamento para administrar individualmente, y
 - b) un sistema indicador de diagnóstico para una propiedad específica del paciente que es relevante para la acción, efecto secundario, interacción, metabolismo, absorción, distribución, metabolismo y eliminación del medicamento que se va a administrar a un paciente,

25 en el que la propiedad específica del paciente se selecciona de entre el grupo que consiste en una sustancia endógena, un mecanismo de regulación, un gen o un sistema de indicación, y en el que el medicamento o el sistema indicador de diagnóstico comprende una nanopartícula conjugada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

Fig. 1

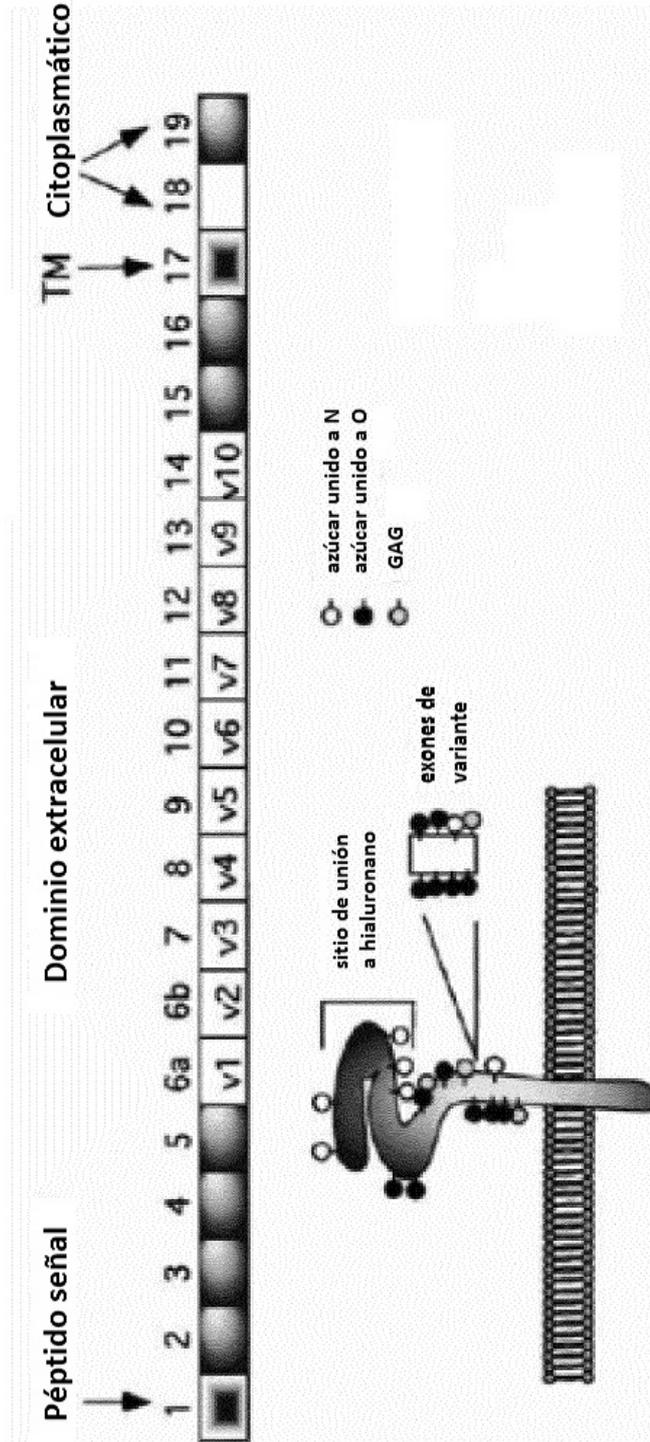


Fig. 2

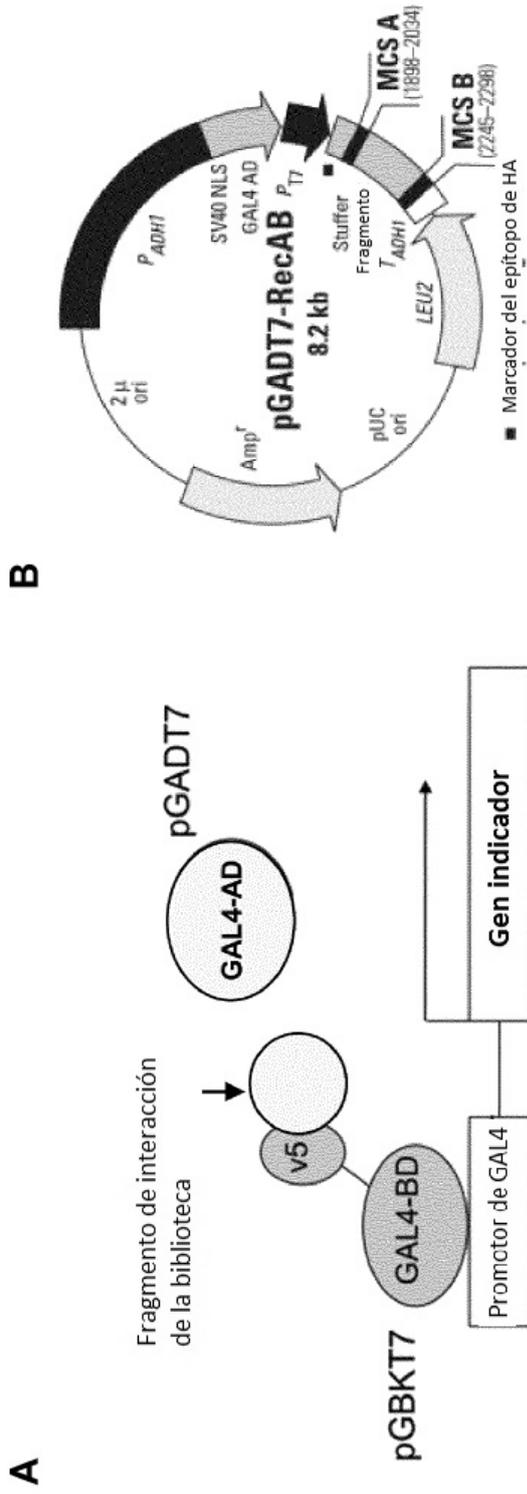


Fig. 3

C1- Clon 03	PGVPGVQLLTANTQSLVLM SAFDI ---- AIEV TFISS.
F2- Clon 14	PGVPGVQLLTANTQSLVLM SAFDI ---- AIEV TFISS.
E3- Clon 23	PGVPGVQLLTANTQSLVLM SAFDI ---- AIEV TFISS.
A4- Clon 28	PGVPGVQLLTANTQSLVLM SAFDI ---- AIEV TFISS.
G3- Clon 26	PG LQISFAVQVPVSVQ ESSPSVQEGIQ VAIE .
H3- Clon 27	PG LQISFAVQVPVSVQ ESSPSVQEGIQ VAIE .
E1- Clon 5	PGGGHERAPASCYNGERLSS QLSFEVQ WETSETLKILVKPLVFCREVDPPC.
H4- Clon 35	PGGGHERAPASCYNGERLSS QLSFEVQ WETSETLKILVKPLVFCREVDPPC.
C3- Clon 21	PG PYYGKLLHVGYLQPLAAVQV SFAPNNTGKEVTVECKIDGSANLKSQDDRDKFLGRVMFKITARA.
G2- Clon 15	(120-YY PYYGKLLQPKYLQPLAAVQ FNLTMTDEIRIECKAYGENIGYSEKDRFQGRFDVKIEVKS.
Consenso	PYYGKLLXXXLYLQPSFAVQVXXSXQ XXXXXXXXXXXXXXXX XXAIE .

Fig. 4

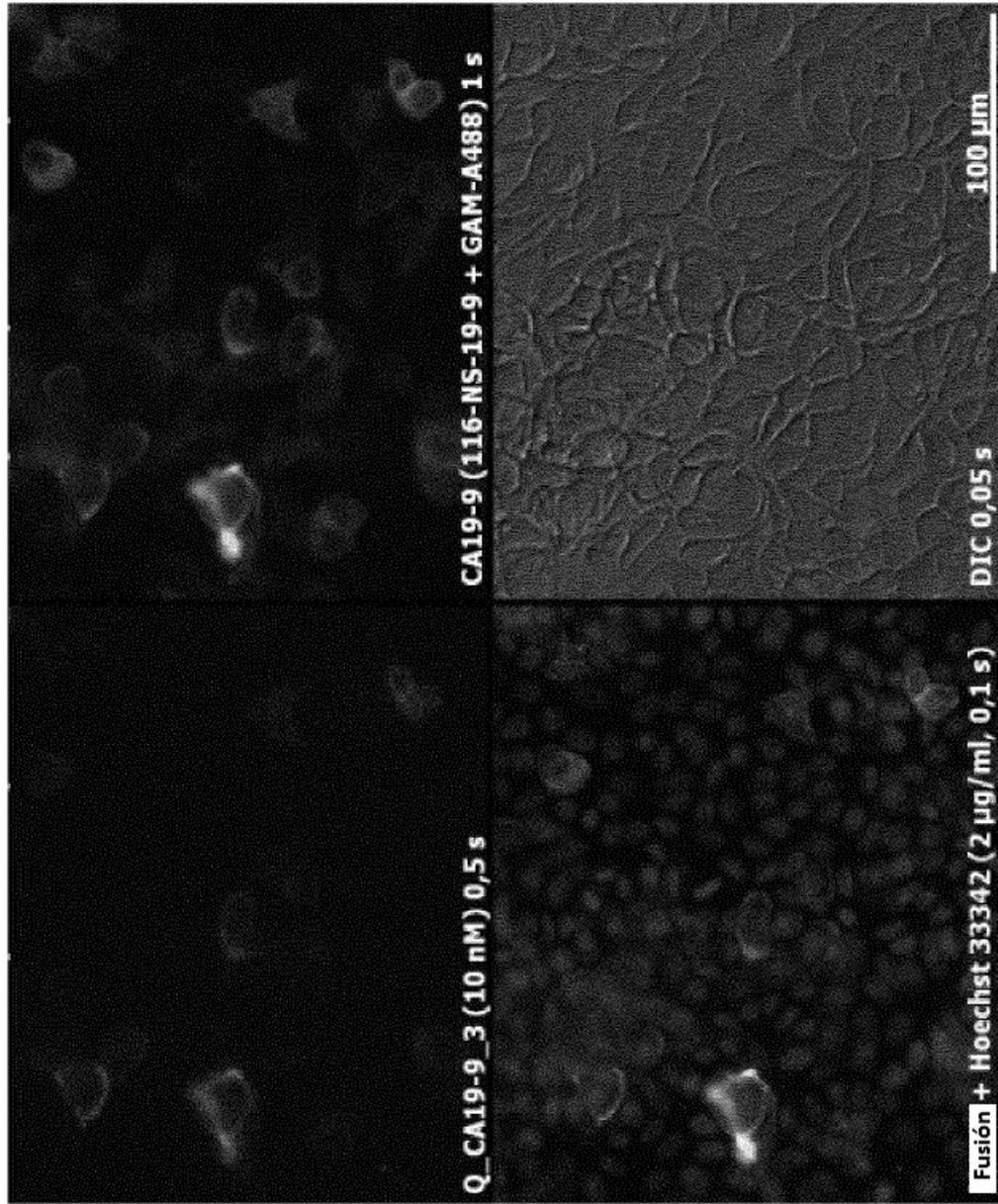


Fig. 5

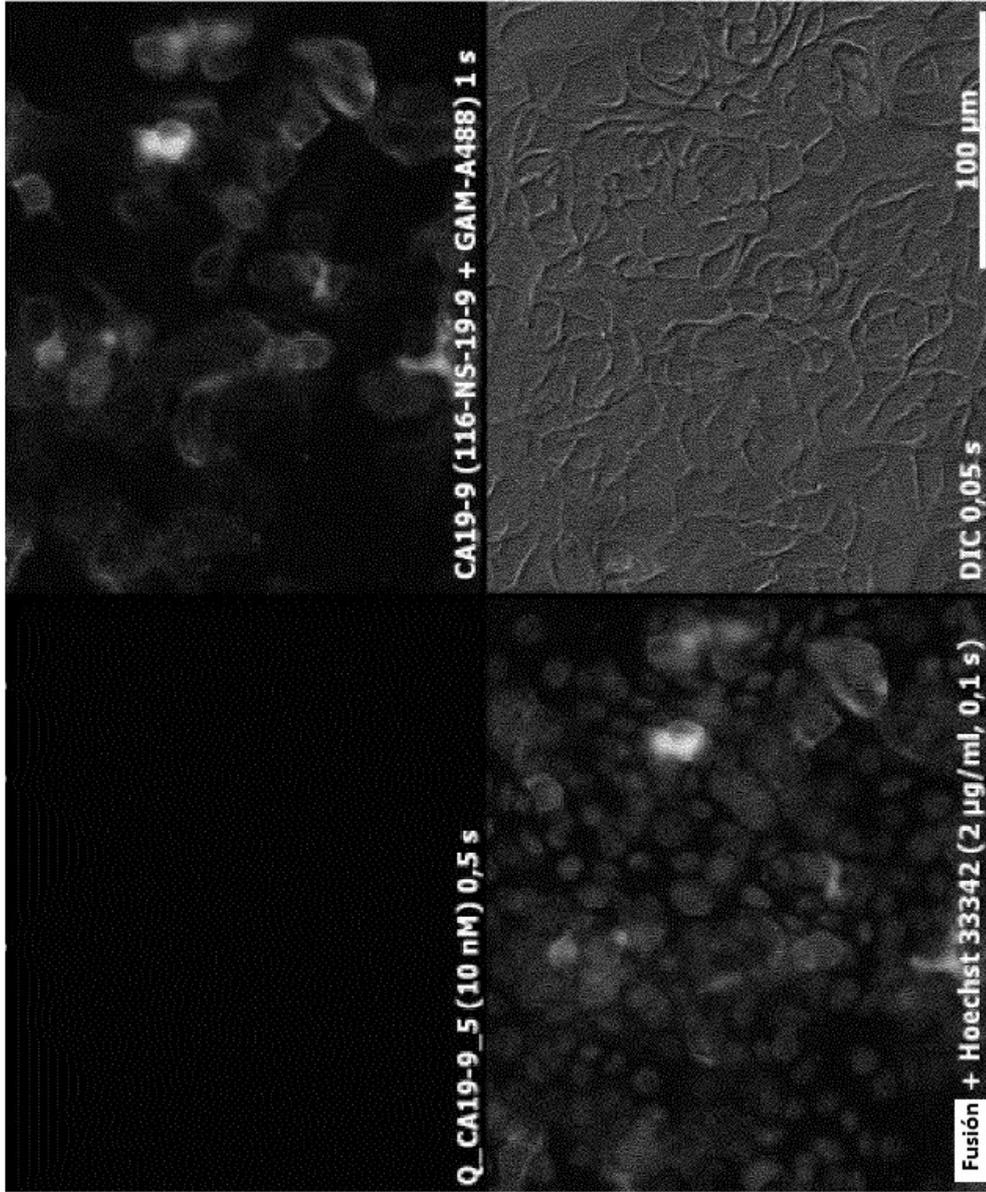


Fig. 6

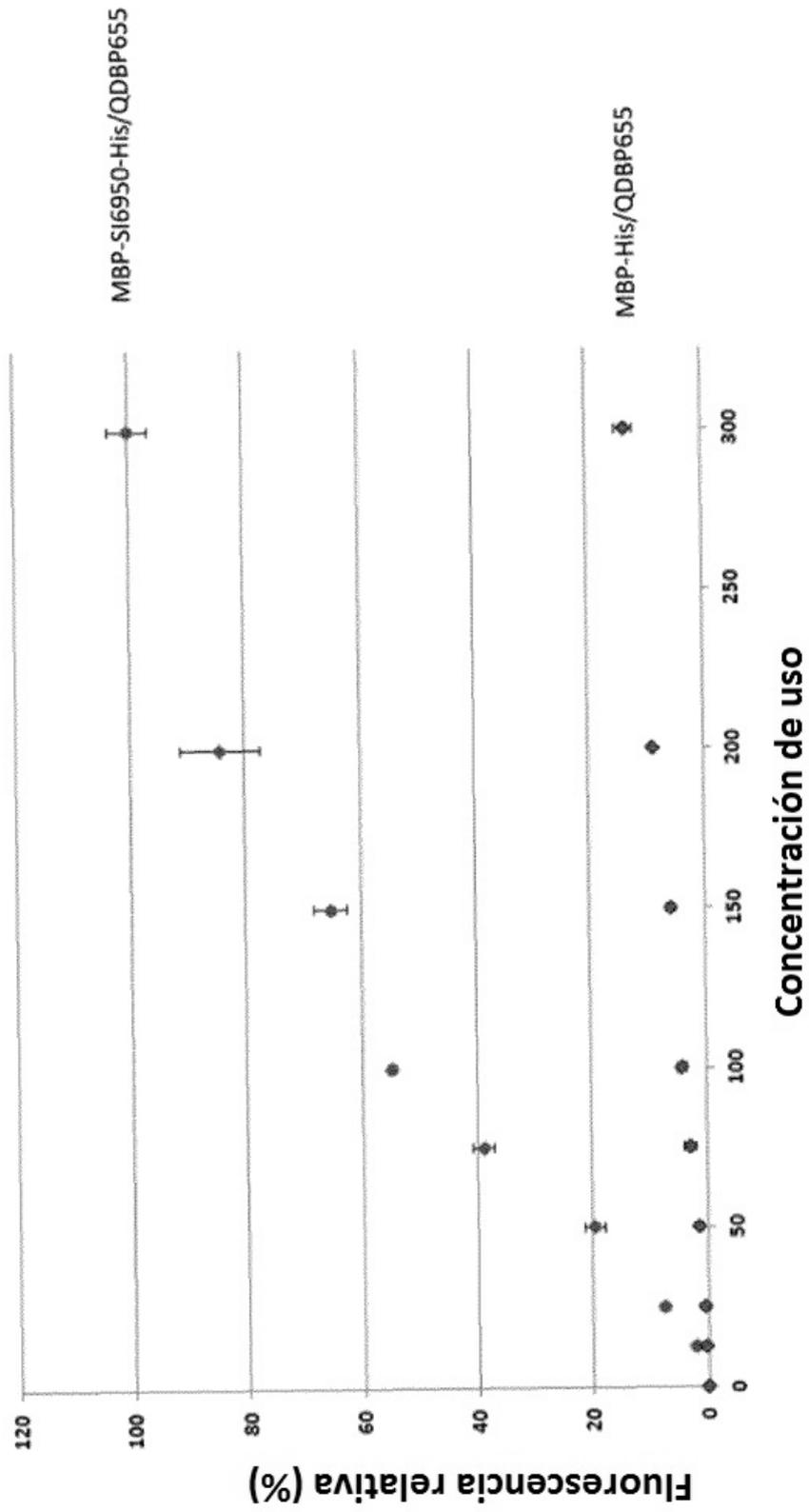


Fig. 7

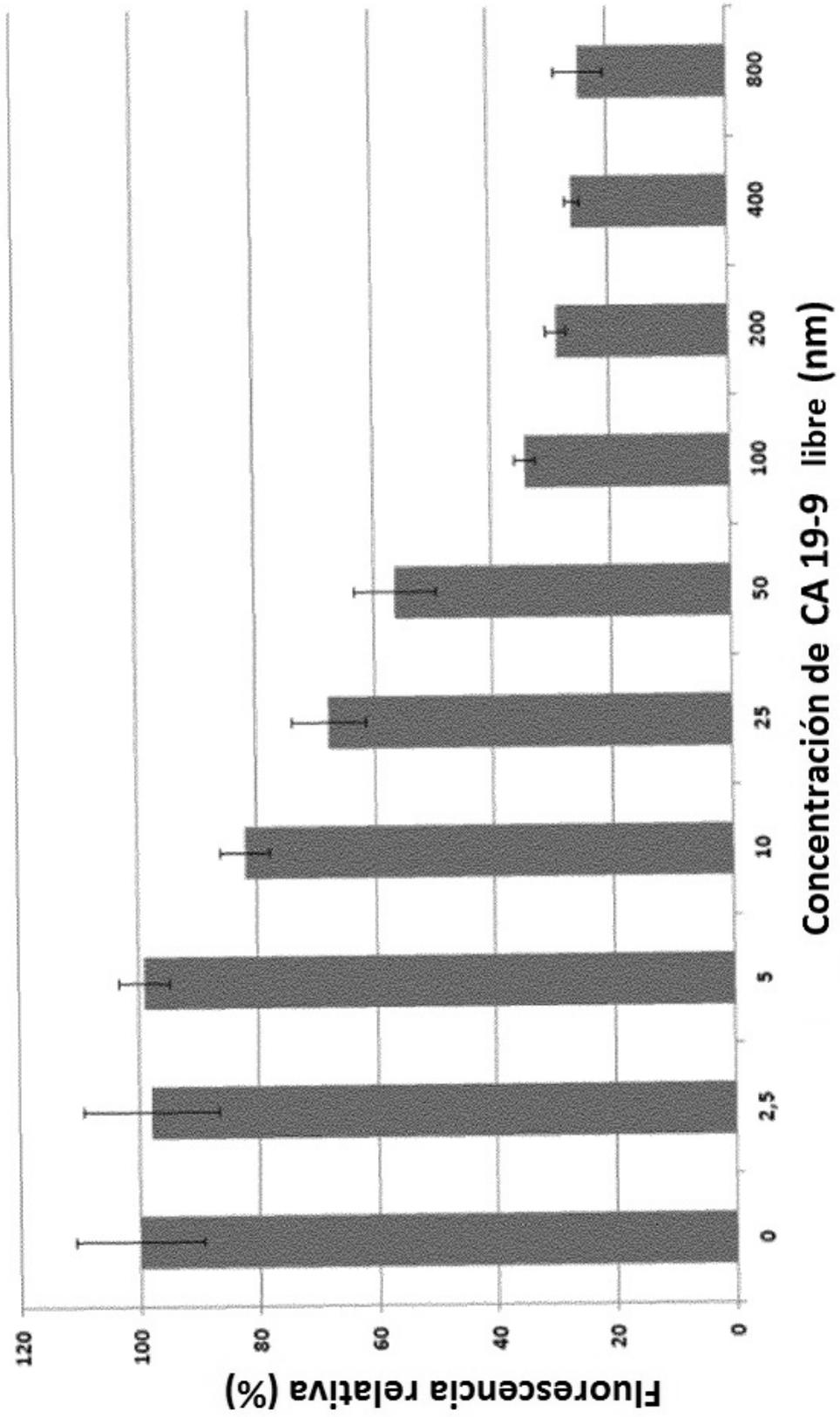


Fig. 8

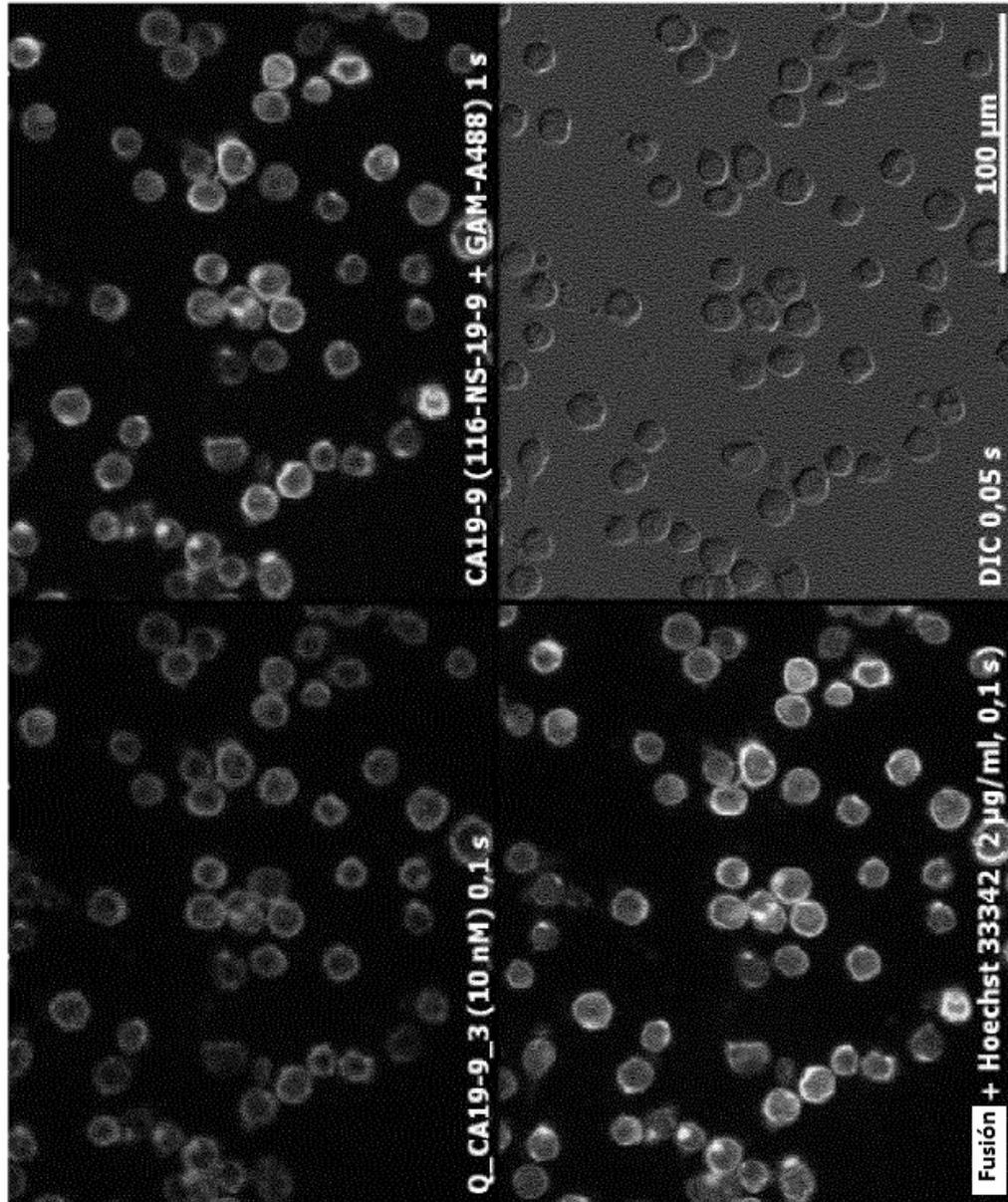


Fig. 9

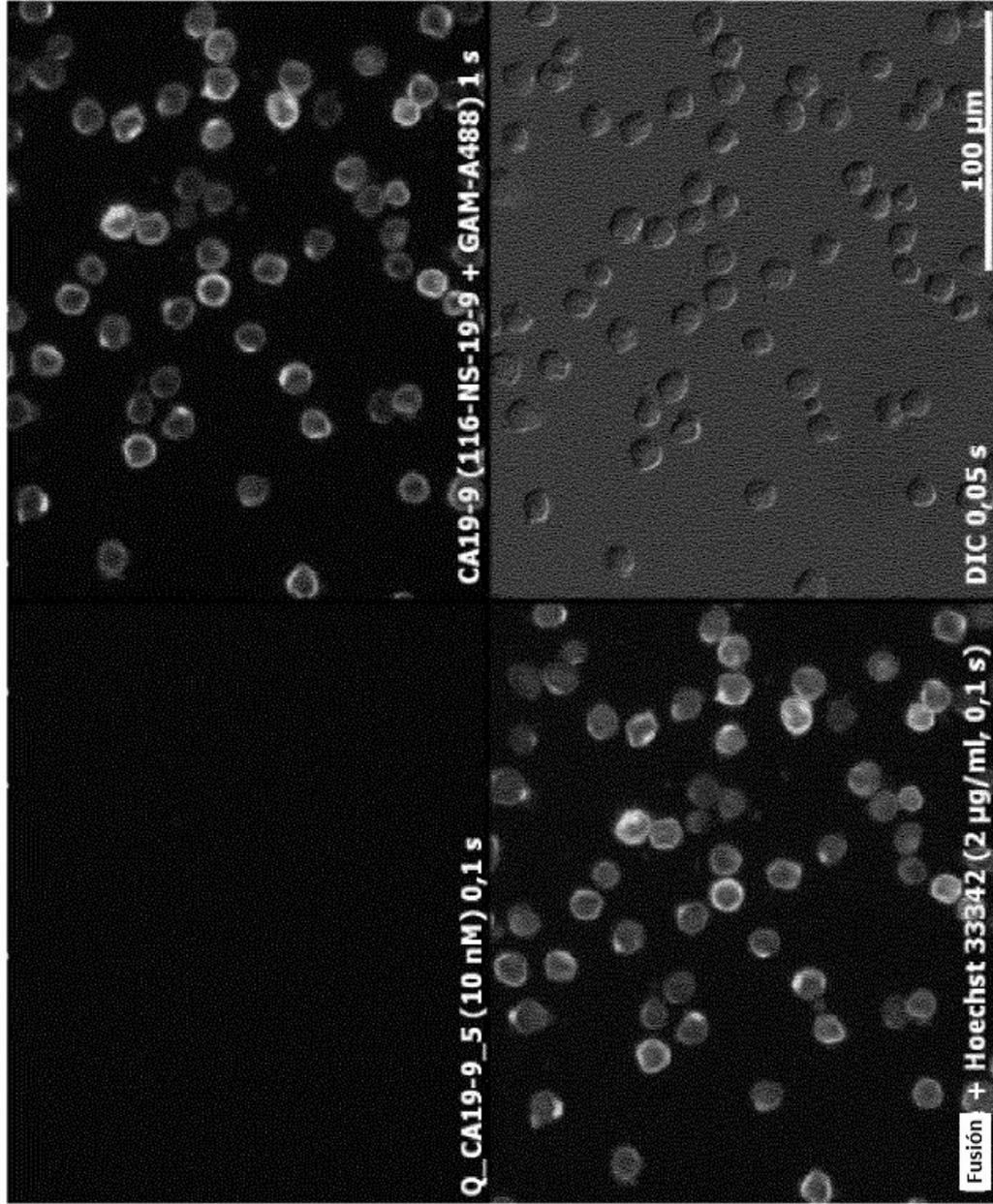


Fig. 10

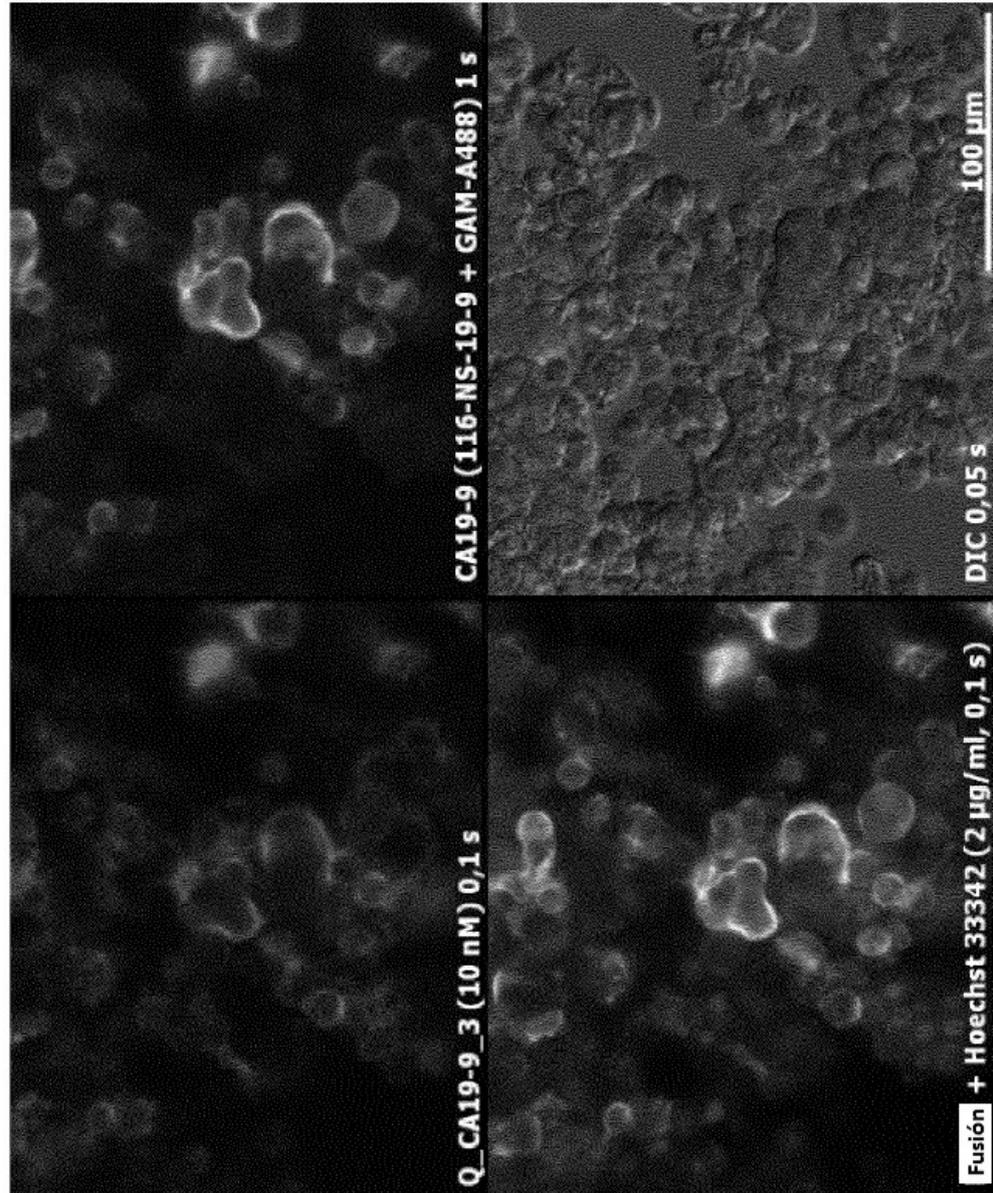


Fig. 11

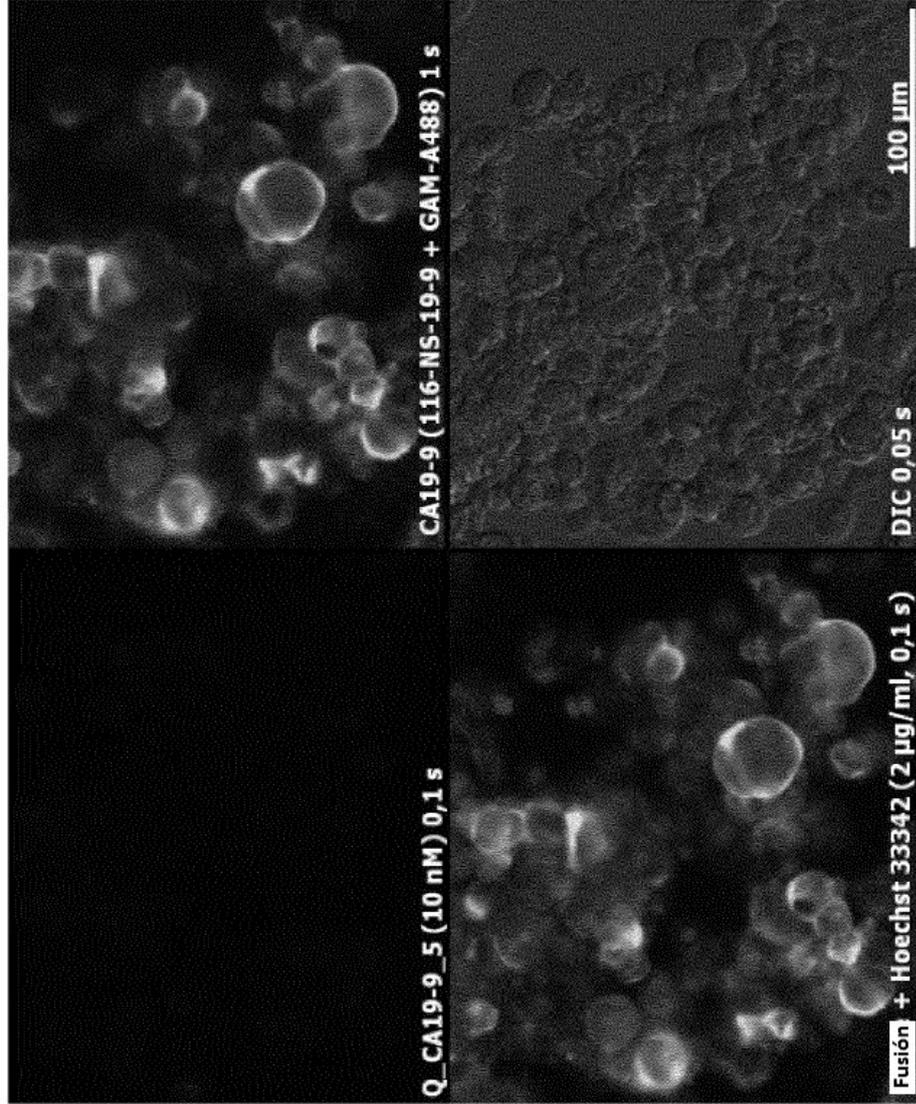


Fig. 12

