

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 012**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2009** **PCT/EP2009/005078**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010** **WO10006753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2009** **E 09777154 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** **EP 2299980**

54 Título: **Nanopartículas de dióxido de silicio y el uso de las mismas para la vacunación**

30 Prioridad:

15.07.2008 DE 102008033175

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

31.10.2017

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**WEIGANDT, MARKUS;
HANEFELD, ANDREA;
KUEBELBECK, ARMIN y
LARBIG, GREGOR**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 640 012 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

Nanopartículas de dióxido de silicio y el uso de las mismas para la vacunación

- La invención se refiere a nanopartículas monodispersas, ultrapequeñas de dióxido de silicio a la superficie de las cuales se fija por lo menos un antígeno para fijación como objetivo de antígenos en células que presentan antígeno y para la activación del sistema inmune, así como en calidad de adyuvante, en cuyo caso la eficiencia de la fijación como objetivo, la inmunoactivación y el efecto como adyuvante se ajusta mediante características de las partículas de acuerdo con las reivindicaciones. Las nanopartículas se pueden utilizar para la inmunoprolifaxis o inmunoterapia del cáncer, así como para la inmunización activa de un mamífero.
- La salud de un organismo animal o humano depende, inter alia, del grado al cual el organismo es capaz de protegerse a sí mismo contra agentes patógenos de su ambiente o del grado al cual el organismo es capaz de reconocer y eliminar material endógeno modificado. El sistema inmune del cuerpo humano o animal, el cual lleva a cabo estas funciones, se puede dividir en dos áreas funcionales: el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra infecciones y la mayoría de agentes patógenos potenciales se vuelven inofensivos antes de que sean capaces de causar, por ejemplo, una infección detectable. El sistema inmune adquirido reacciona a las estructuras superficiales, denominadas antígeno, del organismo que ingresa o del material endógeno modificado.
- Existen dos tipos de respuestas inmunes adquiridas: la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune mediada por células. En la respuesta inmune humoral, los anticuerpos presentes en los fluidos corporales se enlazan a antígenos y provocan la desactivación de los mismos. En la respuesta inmune mediada por células, se activan las células T que pueden destruir otras células. Si, por ejemplo, las proteínas asociadas con una enfermedad están presentes en una célula, son fragmentadas proteolíticamente dentro de la célula para proporcionar péptidos. Las proteínas celulares específicas luego se enlazan a los fragmentos resultantes de la proteína o antígeno y transportan estos últimos a la superficie de la célula, donde son presentados a los mecanismos de defensa moleculares, en particular las células T del cuerpo.
- Las moléculas las cuales transportan los péptidos a la superficie celular y los presentan allí son conocidas como proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). La importancia de las proteínas del MHC también consiste en que hacen posible que las células T distingan los antígenos endógenos de los antígenos exógenos. El conocimiento de la secuencia de un péptido exógeno de este tipo hace posible manipular el sistema inmune contra células enfermas, por ejemplo utilizando vacunas de péptidos.
- Las tecnologías para la presentación de antígenos proteinogénicos o peptídicos en el área de vacunas deben realizar dos trabajos fundamentales: el transporte eficiente del antígeno a las células dendríticas y la activación subsecuente de las mismas a fin de producir una respuesta inmune adquirida. El desarrollo actual de vacunas se enfoca en estrategias moleculares las cuales se dirigen a células dendríticas periféricas, tal como, por ejemplo, en la piel o los músculos, como objetivo. Los antígenos son dirigidos a su lugar de destino dendrítico por, en particular, anticuerpos los cuales son específicos para los receptores de la superficie celular de las células dendríticas y son ya sea fusionados a antígenos o unidos a superficies de las partículas. Sin embargo, estos diseños demandantes de la fijación como objetivo específica para células no son necesarios, como fue mostrado por, inter alia, Fife y colaboradores (2004) J Immunol. 173(5), 3148, quienes causaron una respuesta inmune por medio del transporte de perlas de poliestireno conjugadas con plata a las células dendríticas.
- Además, se sabe en la inmunología emplear adyuvantes a fin de incrementar la respuesta inmune no específicamente a una sustancia determinada. De esta manera, mientras que el antígeno causa la respuesta inmune específica, el adyuvante es esencialmente responsable de la potencia de esta respuesta. A fin de causar una respuesta inmune adquirida, el uso de adyuvantes es vital para la inducción de la maduración de células dendríticas. Las células dendríticas maduran en este punto como resultado de señales moleculares de peligro, las cuales actúan por medio de vías de señalización de la inmunidad congénita, tal como, por ejemplo, los receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) o los receptores de citocinas inflamatorias. El documento WO 2004/108072 A2, por ejemplo, describe un conjugado en el cual los compuestos los cuales modifican la respuesta inmune tales como, por ejemplo, los agonistas de TLR, se enlazan a un soporte de partículas metálicas, el cual además comprende por lo menos un compuesto activo. Sin embargo, los compuestos los cuales modifican la respuesta inmune se deben considerar en este punto como adyuvantes para vacunas, los cuales, aunque causan una fuerte activación de los linfocitos citotóxicos, complican la creación de las partículas y la producción económica de las mismas y están asociados con un riesgo incrementado de toxicidad y restricciones fisiológicas de transporte.
- El documento WO 2001/12221 A1 describe para el dióxido de silicio un efecto adyuvante intrínseco en combinación con antígenos proteinogénicos, células o fragmentos de células, el cual se basa en bordes ásperos y una forma irregular, como consecuencia de lo cual se facilita la penetración de las membranas celulares y la modificación de las proteínas de la superficie. En contraste, el documento WO 2007/030901 A1 y Vallhov y colaboradores (2007), Nano Lett. 7(12), 3576, asocian el efecto adyuvante con la mesoporosidad de las partículas de sílice.

Independientemente de la causa fundamental, el documento EP 0 465 081 B1 ya ha enseñado una preparación que comprende una partícula de núcleo de metal, cerámica (por ejemplo dióxido de silicio) o polímero, un recubrimiento que cubre por lo menos parcialmente la superficie de esta partícula de núcleo, la cual comprende un azúcar básico, un azúcar modificado o un oligonucleótido y por lo menos una proteína o péptido viral el cual está en contacto con la partícula de núcleo recubierta. Las partículas de núcleo tienen un diámetro de 10 a 200 nm, pero se aglomeran para formar partículas más grandes, lo cual incluso se desea, puesto que se llega a establecer de esta manera un efecto de depósito. Es desventajoso que las aglomeraciones de este tipo no permitan generar suspensiones farmacéuticamente estables ni lograr una filtrabilidad estéril.

La invención se basa en el objetivo de superar las desventajas indicadas en la técnica anterior y desarrollar nanopartículas las cuales tienen un tamaño de partícula monodisperso y hacen posible una aplicación efectiva en la inmunoprofilaxis o inmunoterapia, en particular como vacunas, las cuales mejoran la eficacia terapéutica al mismo tiempo que reducen los efectos colaterales.

El objetivo de la invención se alcanza de acuerdo con las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones independientes contienen modalidades preferidas. De acuerdo con la invención, se proporcionan nanopartículas monodispersas para usar como vacuna para fijación como objetivo de antígenos en células que presentan antígeno, para activar el sistema inmune y como adyuvante, las cuales comprenden una matriz la cual comprende más de 50% de dióxido de silicio, y que presentan en su superficie uno o varios grupos químicos en calidad de conectores para fijar y liberar controladamente un antígeno, y al menos un antígeno está enlazado al conector de manera específica al sitio y de modo covalente y las nanopartículas tienen un tamaño de 5 a 50 nm. El tamaño de partícula se debe interpretar en este punto de tal manera que no esté presente una distribución aleatoria en el intervalo completo entre 5 y 50 nm, pero en cambio se selecciona un tamaño de partícula definido dentro del intervalo mencionado anteriormente, del cual la desviación estándar es un máximo de 15%, preferiblemente un máximo de 10%. En una modalidad de la presente invención, las partículas tienen un tamaño entre 10 y 30 nm, preferiblemente entre 20 y 30 nm, de manera particularmente preferible entre 13 y 29 nm, de manera muy particularmente preferible de 25 nm $\pm$ 10%.

Sorprendentemente, se ha mostrado que la provisión de nanopartículas de dióxido de silicio en un intervalo de tamaño reducido entre 5 y 50 nm puede incrementar significativamente la eficacia de la fijación como objetivo de antígenos en células que presentan antígenos. En particular, las células dendríticas periféricas ya no son fijadas como objetivo principalmente, sino en cambio las células dendríticas de los nódulos linfáticos. Las nanopartículas de acuerdo con la invención son diseñadas a través de su tamaño y la elección de materiales de tal manera que tome lugar una inducción efectiva de la maduración de las células dendríticas. Esta inducción ocurre, en particular, por vía de la activación del sistema de complemento. Las nanopartículas de dióxido de silicio de acuerdo con la invención abren de esta manera oportunidades completamente nuevas con respecto a la fijación como objetivo de los nódulos linfáticos que tienen una alta densidad de células dendríticas y con respecto a la vía de maduración de células dendríticas como un pre-requisito para la proliferación e inmunización de células T. Es sobresaliente que una vacuna a base de estas nanopartículas no necesite los adyuvantes los cuales de otra manera serían inevitables en la vacunación.

Hasta la fecha, solo se sabe a partir del documento US 6,086,881 que el material para vacunas debe tener un peso molecular alto el cual incrementa la probabilidad de determinantes antigénicos. Del mismo modo, se desea que el material para vacunas se agregue o absorba en alumbre u otros geles puesto que usualmente se vuelve más efectivo con respecto al enlace a células y la estimulación de moléculas de la superficie celular y el antígeno es retenido en el tejido durante períodos más prolongados debido a la velocidad lenta de desabsorción. También se confirma por Vallhov y colaboradores (2007), Nano Lett. 7(12), 3576, que las partículas más grandes que comprenden dióxido de silicio mesoporoso tienen una influencia mayor sobre las células dendríticas humanas que se derivan de monocitos. Además, los conjugados de antígenos-sílice para la fijación como objetivo en células que presentan antígenos, para las cuales un tamaño de partícula de 0.3 a 20 μ m se considera como un pre-requisito necesario para la fagocitosis, se describen en la técnica anterior de acuerdo con el documento WO 2008/019366 A2. En contraste, la presente invención revela que específicamente las nanopartículas de dióxido de silicio en un intervalo de tamaño reducido, definido de 5 a 50 nm son capaces de la fijación como objetivo de manera pasiva en células que presentan antígenos y de la activación de complemento.

Una "célula que presenta antígenos" en el sentido de la invención se toma para referirse a cualquier célula la cual puede ser inducida para presentar antígenos para una célula T, la cual también incluye células precursoras las cuales son diferenciadas y activadas para las células que presentan antígenos. Las células que presentan antígenos incluyen células dendríticas, células de Langerhans, PBMCs, macrófagos, linfocitos B u otros tipos de células activadas o modificadas, tales como, por ejemplo, células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales las cuales expresan moléculas de MHC sobre sus superficies celulares, preferiblemente células dendríticas, de manera particularmente preferible células dendríticas de los nódulos linfáticos. Los precursores de células que presentan antígenos incluyen células CD34⁺, monocitos, fibroblastos y células endoteliales.

De acuerdo con la invención, la matriz de enlace particulada comprende más de 50% de dióxido de silicio. La matriz de enlace también se puede mezclar de esta manera con componentes adicionales, donde el dióxido de silicio exhibe la proporción más alta en un sistema de múltiples componentes.

Los ejemplos de otros componentes son metales, derivados de metales, óxidos de metales, polímeros, organosilanos, otros materiales cerámicos o vidrio. Se prefiere que la matriz comprenda por lo menos 80% de dióxido de silicio, de manera particularmente preferible por lo menos 90%. En una modalidad muy particularmente preferida de las nanopartículas de acuerdo con la invención, la matriz comprende dióxido de silicio el cual está esencialmente puro, es decir solo comprende las impurezas que se esperan en el curso del proceso de preparación. En una modalidad extremadamente preferida de la invención, la matriz de enlace particulada consiste de dióxido de silicio.

Las partículas se pueden preparar utilizando, inter alia, la síntesis clásica de Stöber, en la cual el dióxido de silicio de escala nanométrica monodisperso de tamaño definido se puede preparar por medio de la hidrólisis de tetrahidroxisilano (TEOS) en un medio acuoso-alcohólico-amoniaco (J. Colloid Interface Sci. 1968, 26, 62). Sorprendentemente, los inventores fueron capaces de mostrar que la estabilidad de las nanopartículas es retenida a pesar de la funcionalización de la superficie, como consecuencia de lo cual se obtienen partículas monodispersas las cuales no tienden hacia la aglomeración. Se da preferencia consecuentemente a nanopartículas producidas por medio de un proceso que tiene los siguientes pasos:

(a) policondensación hidrolítica de tetraalcoxilanos y/u organotrioxilanos en un medio el cual comprende agua, por lo menos un solubilizador y por lo menos una amina o amoníaco, donde en primer lugar se produce un sol de partículas primarias y las nanopartículas resultantes se llevan subsecuentemente al tamaño de partícula deseado en un intervalo de 5 a 50 nm, del cual la desviación estándar es de máximo 15 %, de tal manera que se impide la formación adicional de núcleos por medio de la dosificación continua del silano correspondiente, la cual se controla según la medida de lo que haya reaccionado y

(b) la fijación de un antígeno a una funcionalidad de la superficie de las nanopartículas, en cuyo caso las nanopartículas presentan en su superficie uno o varios grupos químicos en calidad de enlazadores para la fijación y la liberación controlada del antígeno y un antígeno está unido de manera específica al sitio y de modo covalente en el conector.

Si el amoníaco es un constituyente del medio, el solubilizador utilizado es, en particular, alcohol, de modo que la reacción procede en un medio acuoso-alcohólico-amoniaco, proporcionando partículas sumamente monodispersas cuya desviación estándar del diámetro de partícula promedio no es mayor que 10%. Sorprendentemente, los inventores han descubierto ahora que el proceso aún hace posible que diámetros de partícula inferiores a 50 nm se logren con las propiedades monodispersas deseadas. El paso (a) del proceso se describe en detalle en el documento EP 0 216 278 B1 y el documento WO 2005/085135 A1. Por lo menos una amina se utiliza preferiblemente en el medio.

La matriz de dióxido de silicio de las nanopartículas de acuerdo con la invención puede ser ya sea porosa o no porosa. La porosidad es dependiente esencialmente del proceso de producción. En la síntesis de acuerdo con el documento EP 0 216 278 B1, se obtienen en particular partículas no porosas. Dentro del intervalo de entrada de 5 a 50 nm, un tamaño de partícula preferido para las nanopartículas no porosas es entre 10 y 30 nm, mientras que el tamaño de partícula preferido para las partículas porosas es de 10 a 40 nm. Las partículas preferidas de la invención son sólidas.

En conexión con la presente invención, una "nanopartícula" se toma para referirse a una matriz de enlace particulada la cual tiene funcionalidades en su superficie las cuales funcionan como puntos de reconocimiento. La superficie incluye en este punto todas las áreas, es decir además de la superficie exterior, también la superficie interior de cavidades (poros) en la partícula. En una modalidad de acuerdo con la invención, el antígeno puede ser absorbido consecuentemente en las partículas, lo cual requiere la porosidad de la matriz de dióxido de silicio.

La funcionalidad de la superficie puede consistir de uno o más grupos químicos, los cuales pueden ser a su vez idénticos o diferentes, donde los grupos ya sea hacen posible una unión específica de nanopartículas y un antígeno en su propiedad como conectores.

En la presente invención, el antígeno se enlaza covalentemente a la nanopartícula. El enlace covalente puede efectuarse indirectamente. El método indirecto de unión covalente utiliza un conector o etiqueta por vía del cual el antígeno se enlaza de manera específica con el sitio a las partículas y se libera nuevamente de manera controlada. Las etiquetas para la conjugación específica para el sitio son conocidas a partir de la técnica anterior, tales como, por ejemplo, etiqueta SNAP, etiqueta halo, etiqueta LPXTG C-terminal, péptido receptor de biotina, etiqueta PCP o ybbR y se describen, inter alia, en el documento WO 2008/019366 A2.

En una modalidad preferida de la funcionalidad de la superficie, se representa por medio de un conector lábil, de manera particularmente preferible por un conector de hidrazona, conector de disulfuro o una secuencia de péptidos la cual es fácilmente accesible de manera enzimática. En un primer candidato clínico, la doxorubicina se enlaza al polímero por vía de un enlace de hidrazona lábil al ácido como un punto de ruptura nominal (Angew. Chem. 2006, 118, 1218). Las macromoléculas son absorbidas dentro de la célula por medio de la endocitosis, mientras que ocurre una caída significativa en el pH del valor fisiológico en el espacio extracelular (pH 7.2 – 7.4) a pH 6.5 – 6 en el endosoma y a pH 4 en los lisosomas primarios y secundarios. Si el pH cae abajo de 6 como consecuencia de la captación celular, el enlace de hidrazona se rompe y el compuesto activo es liberado por el soporte polimérico. Los conectores escindibles adicionales los cuales son adecuados para los propósitos de la invención y se describen en el curso adicional de la especificación son conocidos para la persona experta en el campo.

En una modalidad preferida adicional, la funcionalidad de la superficie se selecciona del grupo de los alcoxisilanos. Se prefiere particularmente en este punto que sea un grupo tiol reactivo, terminal. Los alcoxisilanos se pueden emplear tanto para la unión del antígeno como también de ligandos adicionales de otras funciones, donde se prefiere la unión de estos últimos por medio de este conector estable. Los alcoxisilanos adecuados para los propósitos de las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden ser seleccionados de manera rutinaria por la persona experta en el campo.

Si la superficie no lleva previamente una funcionalización, dependiendo de la ruta sintética seleccionada, ésta se introduce antes de la unión del antígeno. Si las nanopartículas son producidas por medio de la policondensación hidrolítica de acuerdo con el paso de proceso (a) mencionado anteriormente, la funcionalización de la superficie se lleva a cabo después del paso (a) y antes del paso (b). Muchos de los átomos de silicio sobre la cubierta de la partícula llevan funciones de hidroxilo, las cuales son capaces de reaccionar con una multiplicidad de trialcoxisilanos o triclorosilanos comercialmente disponibles por medio de métodos estándar, lo que significa que las partículas pueden ser funcionalizadas de varias formas en una manera simple (J. Liq. Chrom. & rel. Technol. 1996, 19, 2723). Si las aplicaciones objetivo o las propiedades deseadas de las partículas de dióxido de silicio de escala nanométrica requieren una complejidad química mayor, se utilizan síntesis de múltiples pasos bien estructuradas.

Un “antígeno” se toma en este punto para referirse a una estructura la cual es capaz de generar una respuesta inmune celular o animal. No hace falta decir que la respuesta inmune en un animal incluye todos los mamíferos, en particular humanos. Los antígenos son preferiblemente proteinogénicos, es decir son proteínas, polipéptidos, péptidos o fragmentos de los mismos, los cuales a su vez pueden ser de cualquier tamaño, origen y peso molecular y pueden ser glicosilados, pero contienen por lo menos un determinante antigénico o un epítipo antigénico. El reconocimiento por medio del sistema inmune se efectúa, en particular, a partir de una longitud mínima de tres aminoácidos. Las proteínas o péptidos se seleccionan preferiblemente del grupo de las citocinas, receptores, lectinas, avidinas, lipoproteínas, glicoproteínas, oligopéptidos, ligandos peptídicos y hormonas peptídicas. Los antígenos también pueden ser ácidos nucleicos per se o codificados por ácidos nucleicos, los cuales, después del transporte dentro del núcleo de células que presentan antígenos, son traducidos en el antígeno proteinogénico el cual es presentado a las moléculas de MHC. Los ácidos nucleicos son ADN o ARN de cadena individual y doble y oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos también pueden ser un constituyente de complejos o formulaciones los cuales consisten de lípidos, carbohidratos, proteínas o péptidos. Los antígenos adicionales son polisacáridos, polímeros, sustancias de bajo peso molecular que tienen un peso molecular de 50 a 1000 Da, virus, células procarióticas o eucarióticas intactas o fragmentos celulares.

En una modalidad de la invención, el antígeno tiene un peso molecular menor que 500 kDa. El antígeno es preferiblemente un antígeno del cáncer. Los antígenos del cáncer de este tipo se dan a conocer, por ejemplo, en el documento WO 2008/019366 A2. En una modalidad particularmente preferida, el antígeno del cáncer se selecciona del grupo que consiste del antígeno del esófago de Nueva York (NY-ESO-I), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A10, MAGE-B, MAGE-C1, MAGE-C2, antígeno L (LAGE), SSX2, SSX4, SSX5, PRAME, melan-A, caspasa-8, tirosinasa, MAGF, PSA, CEA, HER2/neu, MUC-1, MART1, BCR-abl, p53, ras, myc, RB-1 y survivina o epítipos de la misma. En una modalidad muy particularmente preferida de la invención, el antígeno del cáncer es survivina o epítipos de la misma. Este antígeno del cáncer se describe en el documento WO 2007/039192 A2.

Las nanopartículas pueden ser multifuncionalizadas, lo cual significa diferentes grupos químicos (funcionalidades de la superficie) y/o diferentes moléculas enlazadas (funciones). Se prefiere que tanto las funcionalidades de la superficie como las funciones enlazadas sean diferentes, dando origen a un enlace independiente, específico de las moléculas funcionales. Las funciones se seleccionan preferiblemente del grupo de antígeno, polietilenglicol (PEG), etiquetado y adyuvante, donde no hace falta decir que el antígeno se selecciona siempre. El antígeno y PEG y/o adyuvante están presentes de manera particularmente preferible, de manera muy particularmente preferible el antígeno, PEG y adyuvante, donde estas funciones se pueden enlazar de manera adsorbente y/o covalente.

En una modalidad de la invención, el etiquetado se detecta por medio de la luminiscencia, coloración de UV/VIS, de manera enzimática, electroquímica o radioactiva. Los tintes fluorescentes o etiquetas radioactivas se utilizan preferiblemente. En el caso de la fotoluminiscencia o fluorescencia, la excitación se lleva a cabo por medio de la

absorción de fotones. Los fluoróforos preferidos son bisbencimidazoles, fluoresceína, anaranjado de acridina, Cy5, Cy3 o yoduro de propidio. La evaluación se lleva a cabo visualmente o utilizando instrumentos de medición apropiados, por ejemplo bajo un microscopio de fluorescencia o por medio de la citometría de flujo, por ejemplo en un citofluorímetro. En una modalidad particularmente preferida de la invención, los tintes fluorescentes se enlazan a

5 3-aminopropiltrietoxisilano, donde el isotiocianato de fluoresceína es un tinte fluorescente muy particularmente preferido.

Alternativamente, la detección también se puede llevar a cabo de manera radioactiva utilizando isótopos radioactivos, preferiblemente utilizando ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In o ^{125}I , de manera particularmente preferida utilizando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{111}In . En particular, los derivados del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo-dodecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), los cuales se enlazan a las nanopartículas por

10 vía de la química clic o modular, son provistos con los radioisótopos particularmente preferidos inmediatamente antes de la inyección. En el caso del conteo de centelleo, un cóctel de moléculas se excita, por ejemplo, por medio de la radiación radioactiva γ . La energía liberada como luz en la transición en el estado fundamental es amplificada por un multiplicador de fotoelectrones y es contada.

15 De esta manera, las nanopartículas de acuerdo con la invención también son importantes como herramienta de diagnóstico (por ejemplo en los métodos de imagenología) y/o herramienta de investigación, la cual hace posible la visualización de la fijación como objetivo y la captación del compuesto activo.

En una modalidad adicional de la invención, un antígeno se combina con una etiqueta de tal manera que la asignación al antígeno se puede llevar a cabo dentro de una fracción de partícula por vía de la etiqueta. Esto

20 significa que una primera partícula o una pluralidad de la misma es provista con un primer antígeno y una primera etiqueta, mientras que una segunda partícula o una pluralidad de la misma es provista con un segundo antígeno y una segunda etiqueta, etcétera, donde tanto los antígenos como también las etiquetas son en cada caso diferentes entre sí. Consecuentemente, la combinación específica de antígeno y etiqueta es única y se prefiere en este documento y hace posible el mezclado de partículas con diferentes antígenos y la supervisión paralela de la

25 eficiencia de fijación como objetivo y/o activación inmune/complemento. Esto da por resultado un ahorro de tiempo en los diagnósticos en comparación con la administración secuencial. Naturalmente, del mismo modo es posible que las partículas lleven una pluralidad de antígenos y una pluralidad de etiquetas cuyas intensidades varían, lo que significa que un cierto antígeno se puede seleccionar de la mezcla. La etiqueta es preferiblemente un tinte fluorescente, el cual se enlaza, en particular, a silano.

30 Adicionalmente, las nanopartículas de la invención se pueden diseñar como combinaciones de antígenos o señales de peligro, tales como, por ejemplo, TLRs o citocinas.

En todavía una modalidad adicional de la presente invención, la superficie es multifuncionalizada de tal manera que la reticulación de las multifuncionalidades se excluye.

La enseñanza anterior de la invención y las modalidades de la misma que se refieren a la funcionalidad de la

35 superficie para la unión de antígenos a nanopartículas son válidas y aplicables sin restricciones a las multifuncionalidades y/o la unión de funciones adicionales a nanopartículas, siempre y cuando parezca apropiado.

Una estrategia universal para la construcción de sistemas sumamente complejos es el concepto de la química clic o modular presentada por K. B. Sharpless (Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40, 2004). Esta es más una filosofía de

40 síntesis que una disciplina científica, la cual es inspirada, en particular, por la simplicidad y eficiencia de reacciones de origen natural. Un ejemplo fundamental de la química clic o modular ha probado ser la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos terminales por medio del método de Huisgen. En presencia de cobre monovalente, estas reacciones tienen lugar con una aceleración drástica y además proceden de manera regioselectiva, en rendimientos muy altos y con tolerancia de un amplio intervalo de grupos funcionales. Una ventaja adicional se encuentra en la

45 posibilidad de llevar a cabo la síntesis en un medio acuoso y a temperatura ambiente, haciendo posible que las biomoléculas interesantes sean unidas de una manera modular y ampliamente aplicable a otros bloques de construcción en un tipo de principio establecido de construcción. Por lo tanto, se prefiere unir las partículas de dióxido de silicio funcionalizadas correspondientemente a las funciones mencionadas anteriormente, en particular los antígenos, utilizando la química clic o modular.

Puede proporcionarse una dispersión la cual comprende las nanopartículas de acuerdo con la invención. Las

50 nanopartículas pueden estar en forma dispersada en cualquier solvente deseado, siempre y cuando las nanopartículas no sean atacadas químicamente ni modificadas físicamente por el solvente, y viceversa, de modo que la nanodispersión resultante sea estable, en particular farmacéutica y físicamente estable. La dispersión se caracteriza específicamente debido a que las nanopartículas están en una forma monodispersa y no agregada y no tienen tendencia hacia la sedimentación, lo cual da por resultado la filtrabilidad estéril. La enseñanza anterior de la

55 invención y las modalidades de la misma que se refieren a las nanopartículas son válidas para y aplicables sin restricciones a las dispersiones, siempre y cuando parezca apropiado.

Un kit que comprende las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o dispersiones de las mismas también puede contener un artículo el cual contiene instrucciones escritas o indica al usuario instrucciones escritas las cuales explican el manejo de las nanopartículas de la invención.

5 Una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de acuerdo con la invención o dispersiones de las mismas es cualquier composición que se puede emplear en la profilaxis, terapia, control o pos-tratamiento de pacientes quienes exhiben, por lo menos temporalmente, una modificación patógena de la condición completa o la condición de partes individuales del organismo del paciente, en particular como consecuencia de enfermedades infecciosas, choque séptico, tumores, cáncer, enfermedades autoinmunes, alergias y procesos de inflamación crónicos o agudos. De esta manera es posible que la composición farmacéutica en el sentido de la invención sea
10 una vacuna. La vacuna puede comprender los antígenos, tales como, por ejemplo, péptidos o ácidos nucleicos, por ejemplo, como una sal farmacéuticamente aceptable. Esta puede ser, inter alia, sales de ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, de ácido fosfórico o sales de ácidos orgánicos.

15 A fin de soportar el efecto médico, es decir, en particular, la respuesta inmune, la vacuna también puede, en una modalidad de la invención, comprender compuestos activos adicionales, donde la administración simultánea o sucesiva es concebible. El efecto terapéutico de la vacuna de acuerdo con la invención puede consistir, por ejemplo, en que a través de la activación del sistema de complemento como un efecto colateral deseado ciertos medicamentos antitumorales actúan mejor tienen un efecto mejor.

20 En una modalidad preferida de la invención, la vacuna de acuerdo con la invención se combina con agentes quimioterapéuticos, los cuales se seleccionan del grupo que comprende citocinas, quimiocinas, agentes pro-apoptóticos, interferones, compuestos radioactivos o combinaciones de los mismos. Se prefiere que el agente quimioterapéutico modifique, en particular reduzca, el metabolismo de ácidos nucleicos y/o proteínas, la división celular, la replicación de ADN, la biosíntesis de purina, pirimidina y/o aminoácidos, la expresión de genes, el procesamiento de ARNm, la síntesis de proteínas, la apoptosis o las combinaciones de los mismos.

25 A fin de estimular las defensas endógenas o de fortalecer el sistema inmune, también es posible, en una modalidad adicional de la invención, administrar inmunoestimulantes, por ejemplo interferones, tales como, por ejemplo, IFN- α , IFN- β o IFN- γ , interleucinas, tales como, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 o IL-12, factores de necrosis tumoral, tales como, por ejemplo, TNF- α o TNF- β , eritropoyetina, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, CD2 o ICAM, con la presente vacuna. De esta manera, se puede estimular la proliferación, el desarrollo, la diferenciación o la activación de, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células neutrófilas,
30 células eosinófilas, megacariocitos y/o granulocitos.

A fin de incrementar la acción protectora o terapéutica de las nanopartículas inmunógenas de acuerdo con la invención, adyuvantes farmacéuticamente tolerados se pueden agregar a las partículas o a la vacuna preparada a partir de las mismas. Cualquier sustancia que permita, refuerce o modifique un efecto, con los antígenos de acuerdo con la invención es un "adyuvante". Los adyuvantes conocidos son, por ejemplo, compuestos de aluminio, tales como, por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, saponinas, tales como, por ejemplo, QS 21, dipéptido de muramilo o tripéptido de muramilo, proteínas, tales como, por ejemplo, gamma-interferón o TNF, MF 59, fosfatidilcolina, escualeno o polioles. La co-aplicación de albúmina de huevo en el adyuvante completo de Freund puede causar del mismo modo una inmunidad incrementada mediada por células y de esta manera puede soportar la acción de los anticuerpos neutralizadores formados. Adicionalmente, el ADN, el cual tiene una propiedad
40 inmunoestimuladora, o el cual codifica una proteína con un efecto adyuvante, tal como, por ejemplo, una citocina, se puede aplicar en paralelo o en un constructo. Sin embargo, debido al efecto adyuvante intrínseco de las nanopartículas a base de dióxido de silicio de acuerdo con la invención se prefiere en el presente caso no utilizar adyuvantes adicionales. Si el efecto adyuvante intrínseco resulta inadecuado en ciertas aplicaciones, por supuesto que es posible adicionalmente unir uno o más adyuvantes a las nanopartículas, preferiblemente solo un adyuvante.
45 El tipo de unión puede ser ya sea adsorbente o también puede consistir de un enlace covalente. Los adyuvantes preferidos de la invención a ser enlazados de manera adsorbente incluyen poloxámeros y TLRs. Los adyuvantes preferidos que se enlazan covalentemente incluyen péptidos de cadena corta, de manera particularmente preferible tuftsin u ovalbúmina.

50 La introducción de la vacuna en una célula o un organismo se puede llevar a cabo de cualquier manera la cual haga posible que las células que presentan antígenos sean puestas en contacto con las nanopartículas o antígenos presentes en la vacuna y sean absorbidos en las células por medio de la fagocitosis, como consecuencia de lo cual se induce una respuesta inmune. La vacuna de la presente invención se puede administrar por la ruta oral, transdérmica, transmucosa, transuretral, vaginal, rectal, pulmonar, entérica y/o parenteral. Se prefiere la administración parenteral de la vacuna. Se ha mostrado en el presente caso que el dióxido de silicio en su propiedad
55 como adyuvante no tiene efectos adversos sobre el balance de lípidos, como se observa para los adyuvantes poliméricos, los cuales no están aprobados consecuentemente para este tipo de aplicación. La inyección directa en el cuerpo se prefiere particularmente. El tipo de administración seleccionado depende de la indicación, la dosis a ser administrada, parámetros específicos del individuo, etcétera. En particular, los diversos tipos de administración facilitan la terapia específica para el sitio, lo cual minimiza los efectos colaterales y reduce la dosis de compuesto

activo. Las inyecciones muy particularmente preferidas son la inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. La administración se puede llevar a cabo, por ejemplo, con la ayuda de las comúnmente llamadas pistolas de vacunación o por medio de jeringas. También es posible preparar la sustancia como un aerosol, el cual es inhalado por el organismo, preferiblemente un paciente humano.

- 5 Las formas de administración de la vacuna se preparan como corresponde al tipo de administración deseado en una dosificación adecuada y de una manera conocida por se utilizando los vehículos y/o diluyentes sólidos o líquidos convencionales y los auxiliares empleados usualmente. De esta manera, los excipientes farmacéuticamente aceptables que son conocidos para la persona experta en el campo pueden formar básicamente parte de la vacuna de acuerdo con la invención, donde la cantidad de material excipiente que se combina con el compuesto activo a fin de preparar una dosis individual varía dependiendo del individuo que es tratado y el tipo de administración. Estos aditivos farmacéuticamente tolerados incluyen sales, amortiguadores, materiales de relleno, estabilizadores, agentes complejantes, antioxidantes, solventes, agentes aglutinantes, lubricantes, recubrimientos de tabletas, sabores, tintes, conservadores, ajustadores y similares. Los ejemplos de excipientes de este tipo son el agua, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, alquilenglicol, polietilenglicol, triacetato de glicerol, gelatina, carbohidratos, tales como, por ejemplo, lactosa o almidón, estearato de magnesio, talco y vaselina.

La formulación farmacéutica se puede usar como tableta, tableta de película, tableta recubierta, cápsula, píldora, polvo, gránulos, jarabe, jugo, gotas, solución, dispersión, suspensión, supositorio, emulsión, implante, crema, gel, ungüento, pasta, loción, suero, aceite, espray, aerosol, pegamento, parche o apósito, prefiriéndose la dispersión.

- 20 La formulación farmacéutica puede estar en la forma de una tableta, tableta recubierta con película, gragea, pastilla para disolución oral, cápsula, píldora, polvo, gránulos, jarabe, jugo, gotas, soluciones, dispersiones o suspensiones, o también como forma de depósito. Formas galénicas como tabletas se pueden obtener, por ejemplo, al mezclar el compuesto activo con auxiliares conocidos, tales como dextrosa, azúcar, sorbitol, manitol, polivinilpirrolidona, desintegrantes, tales como almidón de maíz o ácido algínico, agentes aglutinantes, tales como almidón o gelatina, lubricantes, tales como estearato de magnesio o talco y/o agentes los cuales son capaces de lograr un efecto de depósito, tales como carboxipolimetileno, carboximetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa o acetato de polivinilo. Las tabletas también pueden consistir de una pluralidad de capas. Las grageas se pueden preparar del mismo modo al recubrir núcleos producidos de manera análoga a las tabletas con agentes utilizados usualmente en recubrimientos de grageas, por ejemplo, polivinilpirrolidona o goma laca, goma arábica, talco, dióxido de titanio o azúcar. La cubierta de la gragea en este punto también puede consistir de una pluralidad de capas, donde, por ejemplo, se utilizan los auxiliares mencionados anteriormente. Las cápsulas se pueden producir al mezclar el compuesto activo con vehículos, tales como lactosa o sorbitol, los cuales luego se introducen en cápsulas. Las soluciones o dispersiones de la vacuna se pueden mezclar con sustancias, tales como, por ejemplo, sacarina, ciclamato o tipos de azúcar y/o con aromas, tales como, por ejemplo, extracto de vainilla o naranja, a fin de mejorar el sabor. Adicionalmente, se pueden mezclar con auxiliares de suspensión, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio o conservadores, tales como, por ejemplo, ácido p-hidroxibenzoico, fenol, alcohol bencílico, m-cresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio o cloruro de benzetonio.

- 40 Adicionalmente, las formas de medicamentos parenterales, tales como, por ejemplo, supositorios, suspensiones, emulsiones, implantes o soluciones se deben considerar, preferiblemente las soluciones oleosas o acuosas. Para la administración parenteral, la construcción inmunógena de la invención se puede disolver o suspender en un diluyente fisiológicamente tolerado, tal como, por ejemplo, grasas neutras o polietilenglicoles o derivados de los mismos. Los solventes preferidos que se utilizan son frecuentemente aceites, con o sin la adición de un solubilizador, un agente tensoactivo, un agente de suspensión o un emulsionante. Los ejemplos de aceites utilizados son aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de ricino y aceite de ajonjolí.

- 45 Para la aplicación tópica de la vacuna, esta última se formula de manera convencional con por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, celulosa microcristalina y opcionalmente auxiliares adicionales, tales como, por ejemplo, cremas hidratantes, para proporcionar formulaciones sólidas las cuales se pueden aplicar a la piel, tales como, por ejemplo, cremas, geles, ungüentos, pastas, polvos o emulsiones, o para proporcionar formulaciones líquidas las cuales se pueden aplicar a la piel, tales como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, lociones, sueros, aceites, pulverizaciones o aerosoles. Los ejemplos son soluciones en alcoholes, tales como, por ejemplo, etanol o isopropanol, acetónitrilo, DMF, dimetilacetamida, 1,2-propanodiol o mezclas de los mismos entre sí y/o con agua. Los liposomas, los cuales garantizan el transporte óptimo dentro de la piel, también pueden servir como sistemas portadores para la vacuna. Las preparaciones tópicas adecuadas también son sistemas transdérmicos, tales como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, cremas, ungüentos, polvos, geles, emulsiones, adhesivos, yesos o vendajes, los cuales comprenden las nanopartículas junto con un vehículo. Los vehículos útiles pueden comprender solventes absorbibles, farmacológicamente adecuados a fin de soportar el paso de las nanopartículas a través de la piel. Los solventes los cuales garantizan una buena penetración en la piel son, por ejemplo, los alcoholes fenil-1-etanol, glicerol, etanol o mezclas de los mismos.

La vacuna está preferiblemente en la forma de una solución para inyección. Para la preparación de la solución para inyección, se pueden utilizar medios acuosos, tales como, por ejemplo, agua destilada o soluciones de sales

fisiológicas, donde estas últimas incluyen sales de adición ácidas y básicas. La vacuna también puede estar en la forma de una composición sólida, por ejemplo en el estado liofilizado, y luego se puede preparar antes del uso por medio de la adición de un agente de disolución, tal como, por ejemplo, agua destilada. La persona experta en el campo está familiarizada con los principios básicos de la preparación de liofilizados.

5 La concentración de las nanopartículas activas en la formulación puede variar entre 0,1 a 100 por ciento en peso. Es crucial que la composición farmacéutica comprenda, como compuesto activo, una cantidad efectiva de las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o una dispersión de las mismas junto con los auxiliares farmacéuticamente tolerados. Los términos "cantidad efectiva" o "dosis efectiva" se utilizan de manera intercambiable en este documento e indican una cantidad del compuesto farmacéuticamente activo el cual tiene una
10 acción profiláctica o terapéuticamente relevante sobre una enfermedad o cambio patológico. Una "acción profiláctica" previene el comienzo de una enfermedad o incluso de una infección con un agente patógeno después del ingreso de representantes individuales de tal manera que la propagación subsecuente de los mismos se reduce en gran medida o aún son desactivados completamente. Una "acción terapéuticamente relevante" libera de uno o más síntomas de enfermedad o da por resultado la inversión parcial o completa de uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos los cuales están asociados con o están involucrados causalmente en la enfermedad o cambio patológico, en el estado normal. La dosis o intervalo de dosis respectivo para la administración de las nanopartículas de acuerdo con la invención es suficientemente grande para lograr el efecto profiláctico o terapéutico deseado de la inducción de una respuesta inmune. En general, la dosis variará con la edad, constitución y género del paciente y la gravedad de la enfermedad será tomada en cuenta. No hace falta decir que la dosis específica, frecuencia y duración de la administración son, además, dependientes de una multiplicidad de factores, tales como, por ejemplo, la capacidad de fijación como objetivo y enlace de las nanopartículas, hábitos de nutrición del individuo que es tratado, tipo de administración, velocidad de excreción y combinación con otros medicamentos. La dosis individual se puede ajustar tanto con respecto a la enfermedad primaria como también con respecto a la aparición de cualquier complicación. La dosis precisa puede ser establecida por una persona experta en el campo utilizando
25 medios y métodos conocidos. Esta enseñanza de la invención es válida para y aplicable sin restricciones a la composición farmacéutica que comprende las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o dispersiones de las mismas, siempre y cuando parezca apropiado.

En una modalidad de la invención, las nanopartículas se administran en una dosis de 0,01 mg a 1 g por kilogramo de peso corporal y por día. Sin embargo, las dosis de 20 a 60 mg por kilogramo de peso corporal y por día se administran preferiblemente. La dosis diaria está preferiblemente entre 0,02 y 10 mg/kg de peso corporal.

Las presentes nanopartículas y/o dispersiones de nanopartículas son adecuadas para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades las cuales se seleccionan del grupo de enfermedades infecciosas, choque séptico, tumores, cáncer, enfermedades autoinmunes, alergias y procesos de inflamación crónicos o agudos.

En una modalidad preferida, la enfermedad cancerosa o tumoral que es tratada, prevenida profilácticamente o cuya recurrencia es prevenida se selecciona del grupo de enfermedades cancerosas o tumorales de la región otorrinolaringológica, cavidad mediastínica, tracto gastrointestinal (incluyendo: carcinomas de colon, carcinomas de estómago, cáncer colónico, cáncer del intestino delgado, carcinomas pancreáticos, carcinomas hepáticos), sistema urogenital (incluyendo carcinomas de células renales), sistema ginecológico (incluyendo carcinomas ováricos) y sistema endocrino y de los pulmones (incluyendo cáncer pulmonar), mama (incluyendo carcinomas de mamas) y piel
40 y huesos y sarcomas de partes suaves, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas del sistema nervioso central, enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales pediátricas, linfomas, leucemias, síndromes paraneoplásicos, metástasis sin tumor primario conocido (síndrome CUP), carcinomatosis peritoneales, malignidades relacionadas con la inmunosupresión, mielomas múltiples y metástasis tumorales.

Las enfermedades autoinmunes se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende artritis, hepatitis autoinmune, gastritis crónica, neurodermatitis, psoriasis, artrosis, enfermedades reumáticas, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, inflamación supurante del colon, diabetes, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple y/o inflamaciones alérgicas.

De acuerdo con la invención, las nanopartículas también se emplean para la profilaxis o terapia de enfermedades las cuales son causadas por microorganismos los cuales pueden ser patógenos para los mamíferos. Esto significa que la acción de acuerdo con la invención se dirige ya sea contra microorganismos los cuales son capaces de llevar a cabo procesos que dañan la salud en beneficio propio a través de una alteración en el equilibrio natural de la microflora la cual coloniza un organismo hospedante y/o en el caso de hospedantes los cuales tienen un sistema inmune debilitado, o contra aquellos los cuales son inherentemente patógenos. Los microorganismos preferidos son virus, bacterias, hongos y/o animales unicelulares. Se da preferencia particular a las bacterias, donde las bacterias gram-positivas y gram-negativas son influenciadas en su crecimiento. Los ejemplos de enfermedades las cuales pueden ser tratadas con las nanopartículas son hepatitis B, hepatitis C, VIH, herpes, tuberculosis, lepra o malaria, las cuales son causadas por los microorganismos mencionados anteriormente.

- Es conocido para la persona experta en el campo que la inducción de la proliferación de células T y/o anticuerpos neutralizadores puede ser ventajosa en virtualmente cualquier momento. En el presente caso, las nanopartículas de acuerdo con la invención y las dispersiones de las mismas se emplean principalmente para la inmunoterapia, lo que significa que la vacunación en el sentido de la invención es preferiblemente una administración de la vacuna de acuerdo con la invención después de la diagnosis y/o comienzo de una enfermedad la cual responde a la inmunoterapia. La vacunación se debe llevar a cabo preferiblemente poco después de la diagnosis o comienzo de la enfermedad y también se puede administrar una variedad de veces como terapia a fin de mejorar la respuesta inmune, proliferativa, inicial del organismo mediante varias inyecciones. Consecuentemente, la supervisión también se toma para dar a entender un tipo de tratamiento terapéutico si las nanopartículas se administran en ciertos intervalos, por ejemplo a fin de eliminar completamente los síntomas de una enfermedad. En una modalidad preferida de la presente invención, las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o las dispersiones de las mismas se utilizan para la terapia del cáncer y/o tumores, de manera particularmente preferible para la terapia del cáncer.
- Naturalmente, es ventajosamente posible del mismo modo para la vacunación activa que se desarrolle protección después de la administración profiláctica en el organismo. La inmunoterapia profiláctica es aconsejable, en particular, si un individuo está predispuesto al comienzo de las enfermedades mencionadas anteriormente, tal como, por ejemplo, un historial familiar, un defecto genético o una enfermedad superada recientemente.
- De esta manera, la invención también se refiere al uso de las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o la dispersión de acuerdo con la invención para la inmunoprolifaxis o inmunoterapia. La invención se refiere además al uso de una cantidad efectiva de las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o la dispersión de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna para la inmunoprolifaxis o inmunoterapia. En ambos temas, las enfermedades a ser tratadas se seleccionan del grupo el cual incluye enfermedades infecciosas, choque séptico, tumores, cáncer, enfermedades autoinmunes, alergias y procesos de inflamación crónicos o agudos. La vacuna se prepara, en particular, por medio de métodos no químicos al convertir el compuesto activo en una forma de dosificación adecuada junto con por lo menos un vehículo o auxiliar sólido, líquido y/o semi-líquido y opcionalmente en combinación con uno o más compuestos activos adicionales. La enseñanza anterior de la invención y modalidades de la misma son válidas y aplicables para el uso médico, siempre y cuando parezca apropiado.
- La invención se refiere al uso de las nanopartículas de acuerdo con la invención y/o dispersiones de las mismas para la fijación como objetivo de antígenos en células que presentan antígenos, para la activación del sistema inmune, preferiblemente para la activación del sistema de complemento. La fijación como objetivo se lleva a cabo preferiblemente ex vivo o in vitro al administrar las nanopartículas que llevan antígenos a las células, cultivos de células, tejidos u órganos los cuales comprenden células que presentan antígenos. El uso ex vivo se aplica, en particular, en el caso de células de animales las cuales se originan de un organismo animal el cual está afectado por una enfermedad seleccionada del grupo de enfermedades infecciosas, choque séptico, tumores, cáncer, enfermedades autoinmunes, alergias y procesos de inflamación crónicos o agudos. Las células tratadas ex vivo ya sea pueden continuar manteniéndose en cultivo para investigaciones subsecuentes o pueden ser transferidas dentro de un animal, el cual puede ser el animal hospedante u otro animal. La fijación como objetivo ex vivo de acuerdo con la invención es ventajosa, en particular, a fin de someter a prueba la estructura específica de las nanopartículas con respecto al tamaño de partícula, antígeno, unión y multifuncionalización, haciendo posible que la dosis in vivo sea establecida correspondientemente antes de la evaluación de estos datos ex vivo. Como resultado, el efecto terapéutico en la forma de la respuesta inmune adquirida se incrementa significativamente. Del mismo modo, es posible estimular las células T de un paciente fuera del cuerpo directamente por medio de las células que presentan antígenos las cuales se expusieron a las nanopartículas y luego utilizar las células T para propósitos de investigación.
- En una modalidad preferida la invención, los antígenos se dirigen a células dendríticas. En una modalidad particularmente preferida de esta invención, las células dendríticas están localizadas en los nódulos linfáticos. No hace falta decir que la última modalidad mencionada requiere por lo menos un tejido u órgano, pero en el mejor de los casos un organismo animal intacto. Del mismo modo, no hace falta decir que este pre-requisito debe satisfacerse para la activación inmune o especialmente la activación del complemento.
- Las nanopartículas se pueden utilizar por consiguiente in vivo al administrarlas directamente a un animal, en particular un mamífero, de manera particularmente preferible un humano, por vía de rutas conocidas. Las nanopartículas se pueden emplear adicionalmente ex vivo, donde las células que presentan antígenos se aíslan primero de un animal y se tratan subsecuentemente ex vivo con las nanopartículas de acuerdo con la invención de tal manera que las nanopartículas son absorbidas por las células.
- Un método para la inducción de una respuesta de células T, respuesta de anticuerpos y/o maduración de células dendríticas es caracterizado porque las nanopartículas de acuerdo con la invención, las cuales pueden estar en la forma de una dispersión y/o vacuna, se administran a un mamífero y se inducen la proliferación de células T y/o células dendríticas y/o la formación de anticuerpos neutralizadores. Los organismos preferidos son humanos o

animales. La descripción de las nanopartículas de acuerdo con la invención hace posible que la persona experta en el campo utilice éstas para la inducción de células T y/o anticuerpos neutralizadores.

Es conocido para la persona experta en el campo que es capaz de administrar las nanopartículas de acuerdo con la invención, las cuales por supuesto también se pueden utilizar como vacuna de acuerdo con la invención, en diversas dosificaciones a un organismo, en particular un paciente humano. La administración en este punto se debe llevar a cabo de tal manera que se genere la cantidad más grande posible de células T y/o anticuerpos neutralizadores. La concentración y tipo de administración pueden ser determinados por la persona experta en el campo por medio de experimentos de rutina.

El contacto de las nanopartículas de acuerdo con la invención para usar como vacuna se puede llevar a cabo de manera profiláctica o terapéutica. En el caso de, por ejemplo, la vacunación profiláctica para el desarrollo de la protección de vacunación activa contra enfermedades infecciosas virales, la infección con los virus debe ser prevenida por lo menos de tal manera que, después del ingreso de los virus individuales, por ejemplo en una herida, la multiplicación adicional de los mismos se reduzca en gran medida o que los virus que han ingresado sean eliminados virtualmente por completo. En el caso de la inducción terapéutica de una respuesta inmune, una infección del paciente ya existe y la inducción de las células T y/o anticuerpos neutralizadores se lleva a cabo a fin de eliminar los virus que ya están presentes en el cuerpo o de inhibir su multiplicación.

Todos los constituyentes o componentes mencionados y otros adicionales son conocidos para la persona experta en el campo y se pueden someter a una configuración específica en experimentos de rutina para la enseñanza de acuerdo con la invención.

Dentro de la estructura de la presente invención, un conjugado ultrapequeño de dióxido de silicio-antígeno el cual promueve una respuesta inmune, celular, efectiva después de la vacunación se proporciona de esta manera por primera vez. El conjugado se dirige a un mecanismo de acción doble debido a que es capaz tanto de la fijación como objetivo específica en células que presentan antígenos como también de la activación de complemento simultánea. Las nanopartículas más pequeñas que 50 nm tienen una eficiencia de fijación como objetivo la cual es un múltiplo más alto en comparación con las nanopartículas grandes de la técnica anterior. Como consecuencia de la transferencia eficiente dentro de los vasos linfáticos, el mecanismo biofísico de flujo intersticial se puede utilizar ventajosamente para la fijación como objetivo de células dendríticas de los nódulos linfáticos. La convección de las nanopartículas en esta nueva ruta de transporte hace posible la fijación como objetivo pasiva, como consecuencia de lo cual la fijación como objetivo específica de células complejas es superflua, pero no obstante un número particularmente grande de células son alcanzadas puesto que las células dendríticas están presentes en un gran número en los nódulos linfáticos. Estas propiedades forman la base para el reconocimiento confiable de células dendríticas de los nódulos linfáticos – el cual incluye la ausencia de reactividades cruzadas (incluyendo la fijación como objetivo de células dendríticas periféricas) – y la fagocitosis reproducible, confiable y completa en estas células que presentan antígenos. La segunda propiedad ventajosa de las nanopartículas a base de dióxido de silicio, cuyo efecto adyuvante intrínseco activa el sistema inmune y en particular el sistema de complemento, surte efecto en el objetivo. Mientras que la potencia de la activación es independiente del antígeno seleccionado, se puede modificar por vía del tamaño de partícula. La ausencia de auxiliares y/o modificaciones adicionales de la superficie de las nanopartículas (por ejemplo polihidroxilación) para la activación del sistema inmune o de complemento representa una simplificación y reducción de gastos significativas.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención se caracterizan por el material de matriz inorgánico, inerte y biocompatible, el cual se puede utilizar, en particular, para la vacunación profiláctica o terapéutica. El desarrollo de las nanopartículas que comprenden el conjugado de dióxido de silicio/antígeno presentado en este punto es del mismo modo una estrategia sumamente prometedora para mejorar el índice terapéutico de compuestos activos citotóxicos. En particular, la unión lábil de los constituyentes asegura la liberación del agente terapéutico antigénico en compartimientos específicos del cuerpo, lo que significa que se puede esperar una reducción en los posibles efectos colaterales. Las nanopartículas también se distinguen por una estabilidad farmacéutica alta y son fáciles de manejar, cuando menos debido a su tamaño pequeño. Las nanodispersiones ultrafinas que comprenden partículas de tamaño monodisperso son ventajosamente adecuadas para la filtrabilidad estéril.

No hace falta decir que esta invención no está restringida a los métodos, partículas y condiciones específicos que se describen en este documento, puesto que estas cosas pueden variar. Además, no hace falta decir que la terminología utilizada en este punto sirve exclusivamente para el propósito de descripción de modalidades particulares y no tiene la intención de restringir el alcance de la protección de la invención. Como se utiliza en este punto en la especificación, incluyendo las reivindicaciones anexas, las formas de palabras en singular, tales como, por ejemplo, “un”, “una”, “el” o “la” incluyen el equivalente en plural, siempre y cuando el contexto no indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a “un antígeno” incluye un antígeno individual o una pluralidad de antígenos, los cuales a su vez pueden ser idénticos o diferentes o la referencia a “un método” incluye pasos y métodos equivalentes los cuales son conocidos para la persona experta en el campo.

La invención se explica con mayor detalle a continuación con referencia a los ejemplos no limitantes de modalidades específicas. Los ejemplos se deben interpretar, en particular, como que no están restringidos a las combinaciones de características que se ilustran específicamente, sino que en cambio las características ilustrativas a su vez se pueden combinar libremente siempre y cuando se alcance el objetivo de la invención.

5 **Ejemplo 1: Producción de partículas de dióxido de silicio monodispersas**

La producción de las partículas de dióxido de silicio monodispersas se llevó a cabo – como se describe en el documento EP 0 216 278 B1 – por medio de la hidrólisis de tetraalcoxisilanos en un medio acuoso-alcohólico-amoniacoal, donde en primer lugar se produce un sol de partículas primarias y las partículas de SiO₂ obtenidas se llevan subsecuentemente al tamaño de partícula deseado por medio de la medición de entrada continua de tetraalcoxisilano de una manera controlada que corresponde al grado de reacción. La producción de 50 g de partículas de SiO₂ que tienen un tamaño de 25 nm requiere, por ejemplo, 1,2 l de EtOH como solubilizador, 860 ml de agua desionizada, 167 ml de ortosilicato de tetraetil (TEOS) y 28,5 ml de solución de amoníaco acuosa al 25%.

Las partículas esféricas de dióxido de silicio se determinaron por medio de mediciones de dispersión luminosa dinámica utilizando un dispositivo Zetasizer Nano ZSMR (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania). El PDI-Malvern (índice de polidispersidad) que tenía valores <0,1 mostró una distribución monodispersa. La Figura 1 ilustra el tamaño y morfología de partícula por medio de una fotomicrografía de SEM.

Ejemplo 2: Preparación del fragmento de péptido de OVA SIINFEKL que tiene un grupo alquino N-terminal

El péptido se construyó en una resina de amida Rink por medio de la química de Fmoc. Se emplearon aminoácidos protegidos con N-alfa-Fmoc que tenían grupos protectores de cadena lateral adecuados. El solvente utilizado fue N-metilpirrolidona. En primer lugar, la cadena de péptidos se creó en un sintetizador automático (Applied Biosystems Modelo ABI 433 A). Después de la terminación de la secuencia, el grupo protector de Fmoc terminal se escindió. El polímero se acopló manualmente al ácido alquinocarboxílico en una jeringa. Se lavó cuidadosamente con DMF, seguido por diclorometano y metanol y la resina se secó in vacuo durante toda la noche. Para la escisión y desprotección, 5 ml de una mezcla de TFA/H₂O/fenol/triisopropilsilano (37:1:1:1) se agregaron a la resina y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de TFA se transfirió dentro de un tubo de centrifuga y se precipitó por medio de la adición lenta de éter dietílico a 4°C, se centrifugó, se lavó dos veces por medio de la adición de éter dietílico, se secó y se tomó en 2 ml de H₂O/acetonitrilo (1:1 v/v). La purificación se llevó a cabo por medio de RP-HPLC utilizando una columna B selecta para RP (150 x 10 mm) con un gradiente de 0% de B - 100% de B en 7,5 minutos (A = H₂O y B = acetonitrilo, ambos que comprendían 0.1% de TFA), velocidad de flujo = 10 ml/minuto. La homogeneidad e identidad del producto purificado se confirmó por medio de la HPLC analítica y la espectrometría de masas. Después de la purificación mediante la RP-HPLC, el péptido se liofilizó.

Ejemplo 3: Funcionalización de las partículas de dióxido de silicio con 3-bromopropiltrimetoxisilano

1 g de las partículas de SiO₂ (25 nm) producidas en el Ejemplo 1 se suspendió en una mezcla de etanol/agua (100 ml; 4:1) y se agregó 0,3 ml de solución de amoníaco acuosa al 25%. 0,25 ml del 3-bromopropiltrimetoxisilano (ABCR, Karlsruhe, Alemania), disueltos en 10 ml de etanol, se agregaron lentamente con posterioridad gota a gota por vía de un embudo cuenta gotas y la mezcla se calentó bajo reflujo durante aproximadamente 20 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y las partículas de SiO₂ se lavaron 5 x con una mezcla de etanol/agua (4:1). Todos los pasos de lavado se llevaron a cabo por medio de la centrifugación durante 10 minutos a 9000 x g y 20°C en una centrífuga de temperatura controlada en recipientes de reacción de 50 ml y por medio de la resuspensión de las partículas utilizando un dedo de ultrasonido.

Ejemplo 4: Reacción de las partículas funcionalizadas de dióxido de silicio con azida de sodio

Las partículas de SiO₂ funcionalizadas con 3-bromopropiltrimetoxisilano en el tercer ejemplo se dispersaron de nuevo en 80 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO), se agregaron 1 g de azida de sodio y 100 mg de bromuro de tetrabutilamonio y la mezcla se agitó a 80°C durante 40 horas. 200 ml de agua desionizada se agregaron subsecuentemente y las partículas se aislaron por medio de un método de ultrafiltración utilizando una membrana con una capacidad de retención de 10 kDa (Millipore, Bedford, EUA) y se lavaron con 600 ml de agua desionizada.

Ejemplo 5: Unión del fragmento de péptido de OVA SIINFEKL a las partículas funcionalizadas de SiO₂

Las partículas de azida-SiO₂ producidas en el cuarto ejemplo se resuspendieron en 40 ml de acetonitrilo, el fragmento de péptido de OVA del Ejemplo 1 (SIINFEKL-alquino), diisopropiletilamina (DIPEA) y yoduro de cobre (I) se agregaron y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas. 100 ml de agua desionizada se agregaron a la suspensión, el producto se aisló por medio de la ultrafiltración por vía de una membrana de 10 kDa (Millipore, Bedford, EUA) y se lavó con 200 ml de agua desionizada y 50 ml de solución acuosa de EDTA.

Ejemplo 6: Prueba de las nanopartículas de sílice para la actividad adyuvante in vivo utilizando fenotipos de PBL (linfocitos de sangre periférica) como lectura

Las investigaciones se llevaron a cabo en ratones C57B1/6. Los animales se dividieron en 3 grupos (2 ratones por grupo) a los cuales se les administró ya sea PBS (solución salina amortiguada con fosfato), LPS (lipopolisacárido) o nanopartículas de sílice (25 nm). La PBS sirvió como control y el LPS como referencia (agonista de TLR4) comparado contra las nanopartículas de sílice con respecto a su actividad adyuvante.

En el experimento, se investigaron las nanopartículas de sílice no modificadas que tenían un tamaño de 25 nm las cuales se produjeron por medio del método descrito en el Ejemplo 1, se dializaron y subsecuentemente se filtraron en condiciones estériles. La dispersión de sílice se investigó subsecuentemente por las endotoxinas a fin de asegurar que la lectura del experimento en animales no sería falsificado por la contaminación con endotoxinas de las nanopartículas. La concentración de endotoxinas en la dispersión de nanopartículas investigada fue inferior al nivel máximo recomendado por Ph.Eur. para formulaciones parenterales, líquidas de 0,5 IU/ml.

100 µl de cada una de las soluciones o de una dispersión de prueba se administraron s.c. (por la ruta subcutánea) a los animales en el flanco. La dispersión de nanopartículas comprendía 450 µg de nanopartículas de sílice en 100 µl de PBS. Como referencia, 10 µg/ratón de LPS se administraron.

75-100 µl de sangre periférica/ratón se tomaron mediante el sangrado retro-orbital por medio de un tubo capilar heparinizado y se recolectaron en tasas heparinizadas de Eppendorf. Las muestras de sangre se etiquetaron con varios cócteles de detección. El porcentaje de distribución de fenotipos de PBL inmunológicamente relevantes se determinó subsecuentemente por medio de la FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia). En las Figuras 2a-c, el porcentaje de proporción de las cuatro subpoblaciones de PBL CD4 (Figura 2a), CD8 efectoras (Figura 2b), CD11b+ y CD11c+(DC) (Figura 2c) con respecto a la población total de PBL se representó en una gráfica. Los datos confirman que, después de la administración de las nanopartículas de sílice, el número de células T y células dendríticas inmunológicamente importantes se incrementó en comparación con el PBS de control de vehículo, lo cual indica un efecto adyuvante de las nanopartículas de sílice.

Ejemplo 7: Etiquetado con ^{99m}Tc de nanopartículas de sílice en agua

La solución de nanopartículas (25 nm, contenido de sólidos 9,0 mg/ml) se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 µm MILEX-GV antes del uso. 50 µl de nanopartículas de sílice se agregaron a ^{99m}Tc (132 MBq en 40 µl) y la solución se mezcló. Luego se agregaron 2 µl de una solución de SnCl₂ (0,1% de dihidrato de SnCl₂ en HCl de 10 mM) y la solución se mezcló nuevamente. Después de aproximadamente 2 minutos, 150 µl de amortiguador de fosfato 0,5 M pH 8 se agregaron y la solución se transfirió en un dispositivo de filtro de centrifuga Millipore Microcon Ultracel YM-100 y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. El filtro se lavó dos veces con 200 µl de amortiguador de fosfato 0,5 M pH 8 cada vez. El producto filtrado total comprendió 46,84 MBq de ^{99m}Tc. 69.8 BMq de ^{99m}Tc permanecieron en el filtro. Las partículas en el filtro se suspendieron dos veces en 200 µl de amortiguador de fosfato 0,5 M pH 8 cada vez y se recuperaron por medio de la rotación del filtro y la centrifugación breve. Se obtuvo una suspensión de partículas etiquetada con 28 MBq de ^{99m}Tc. La suspensión de partículas obtenida se utilizó subsecuentemente para el experimento en animales.

Ejemplo 8: Formación de imágenes in vivo de las nanopartículas de sílice etiquetadas con ^{99m}Tc

Las partículas se etiquetaron como se describiera en el Ejemplo 7. La formación de imágenes no invasiva de la migración en los nódulos linfáticos centinelas se llevó a cabo subsecuentemente. Para este propósito, las ratas hembra Wistar que pesaban aproximadamente 400-500 g se anestesiaron por medio de la inhalación de anestesia utilizando isoflurano. A los animales se les proporcionó una inyección subcutánea de una suspensión clara de las partículas radioetiquetadas que comprendían 10-20 MBq de ^{99m}Tc en una de las dos patas posteriores. Los animales, aún bajo anestesia, se investigaron subsecuentemente por medio de la cintigrafía. Para este propósito, la acumulación en el cuerpo inferior de los animales en varios momentos se exhibió utilizando una cámara de centelleo de rayos gamma. La cinética de estas fotografías muestra una acumulación significativa de las partículas en los nódulos linfáticos que se desvían de la pata posterior (véase la Figura 3). Estos son los nódulos linfáticos centinelas. Además, una acumulación transitoria en los riñones y la vejiga es evidente. En contraste, la acumulación en el nódulo linfático es continua durante 24 horas. Se observaron tasas de migración de aproximadamente 1% de la dosis administrada. Como experimento de control, se llevó a cabo el análisis de la migración de Nano-AlbumonMR etiquetado con ^{99m}Tc, una preparación coloidal comercialmente disponible para la formación de imágenes del nódulo linfático centinela. La acumulación de esta sustancia fue comparable a aquella de las partículas de sílice. Por medio de un experimento de control adicional, en el cual se administró ^{99m}Tc libre por medio de una inyección subcutánea en una de las dos patas posteriores de ratas hembra Wistar, se aseguró que el ^{99m}Tc libre no se acumulara en el nódulo linfático.

De esta manera, pudo mostrarse que las nanopartículas de sílice son capaces de fijar como objetivo los nódulos linfáticos, por vía de lo cual puede efectuarse la activación del sistema inmune.

Los siguientes ejemplos se refieren a preparaciones farmacéuticas.

Ejemplo A: Frascuitos para inyección

- 5 Una solución de 100 g de nanopartículas y 5 g de hidrofosfato disódico en 3 l de agua destilada se ajusta a pH 6,8 utilizando ácido clorhídrico 2 N, se filtra en condiciones estériles, se transfiere dentro de frascuitos para inyección, se liofiliza bajo condiciones estériles y se sella bajo condiciones estériles. Cada frascuito para inyección contiene 5 mg de nanopartículas.

Ejemplo B: Supositorios

- 10 Una mezcla de 20 g de nanopartículas con 100 g de lecitina de soya y 1400 g de manteca de cacao se funde, se vierte en moldes y se deja enfriar. Cada supositorio contiene 20 mg de nanopartículas.

Ejemplo C: Solución

- 15 Una solución se prepara a partir de 1 g de nanopartículas, 9,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de cloruro de benzalconio en 940 ml de agua bidestilada. El pH se ajusta a 6,8 y la solución se conforma hasta 1 l y se esteriliza por medio de la irradiación. Esta solución se puede utilizar en la forma de colirio.

Ejemplo D: Ungüento

500 mg de nanopartículas se mezclan con 99,5 g de vaselina bajo condiciones asépticas.

Ejemplo E: Tabletas

- 20 Una mezcla de 1 kg de nanopartículas, 4 kg de lactosa, 1,2 kg de almidón de papa, 0,2 kg de talco y 0,1 kg de estearato de magnesio se presiona para proporcionar tabletas de manera convencional de tal modo que cada tableta contiene 10 mg de nanopartículas.

Ejemplo F: Grageas

Las tabletas se presionan de manera análoga al Ejemplo E y se recubren subsecuentemente de manera convencional con un recubrimiento de sacarosa, almidón de papa, talco, tragacanto y tinte.

25 **Ejemplo G: Cápsulas**

2 kg de nanopartículas se introducen en cápsulas de gelatina dura de manera convencional de tal modo que cada cápsula contiene 20 mg de las nanopartículas.

Ejemplo H: Ampolletas

- 30 Una solución de 1 kg de nanopartículas en 60 l de agua bidestilada se filtra en condiciones estériles, se transfiere dentro de ampolletas, se liofiliza bajo condiciones estériles y se sella bajo condiciones estériles, cada ampolleta contiene 10 mg de nanopartículas.

Ejemplo I: Pulverización para inhalación

- 35 14 g de nanopartículas se disuelven en 10 l de solución isotónica de NaCl y la solución se introduce en recipientes de pulverización comercialmente disponibles con un mecanismo de bomba. La solución se puede pulverizar dentro de la boca o la nariz. Un disparo de pulverización (aproximadamente 0,1 ml) corresponde a una dosis de aproximadamente 0,14 mg.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Nanopartículas monodispersas que comprenden una matriz de más de 50% de dióxido de silicio que presentan en su superficie uno o más grupos químicos como conectores para fijar y liberar de manera controlada un antígeno, y al menos un antígeno se enlaza de modo específico al sitio y de modo covalente al conector, y las partículas tienen un tamaño de 5 a 50 nm, del cual la desviación estándar es de máximo 15% para el uso como vacuna para la fijación como objetivo de antígenos en células que presentan antígeno, para activar el sistema inmune y como adyuvante.
2. Las nanopartículas para el uso de conformidad con la reivindicación 1, en cuyo caso las nanopartículas no comprenden otros adyuvantes.
- 10 3. Las nanopartículas para el uso de conformidad con la reivindicación 1 o 2 en cuyo caso el conector es un alcoxisilano.
4. Nanopartículas para el uso de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 3 para la fijación como objetivo de los antígenos en células dendríticas en nodos linfáticos.
5. Nanopartículas para el uso de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 4 para la activación del sistema de complemento.

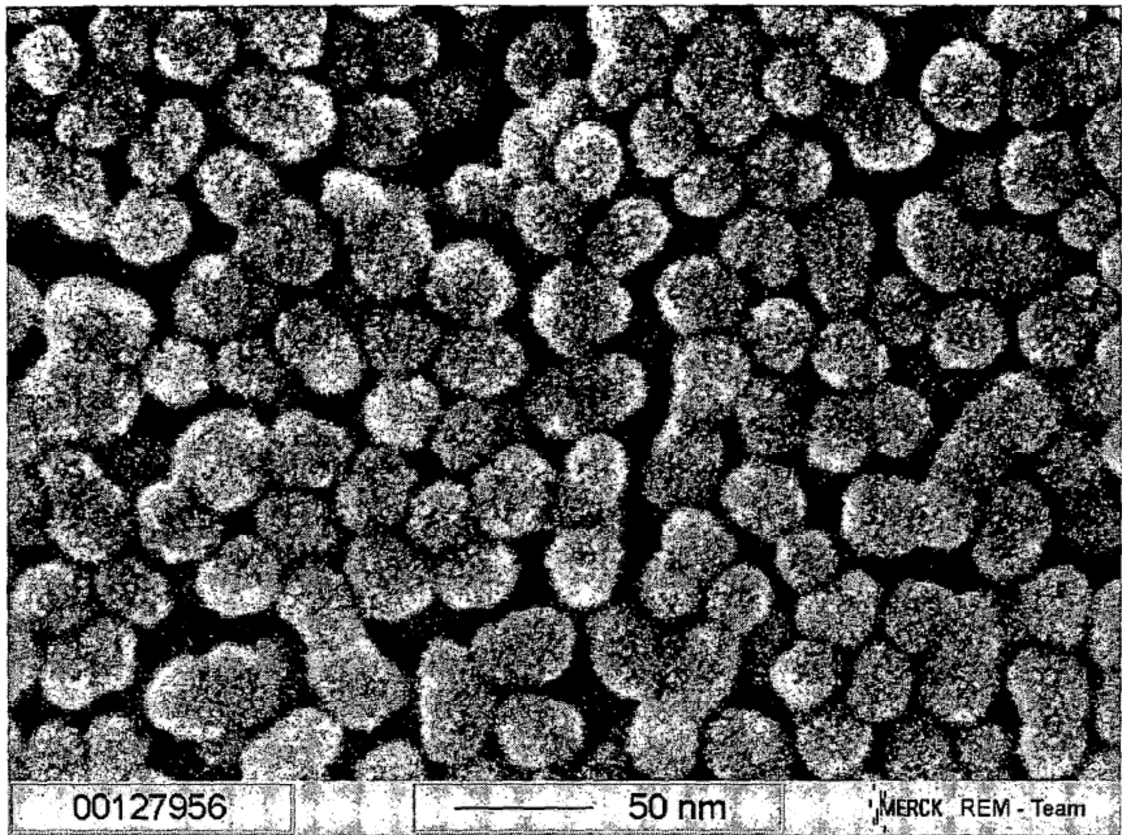


Figura 1

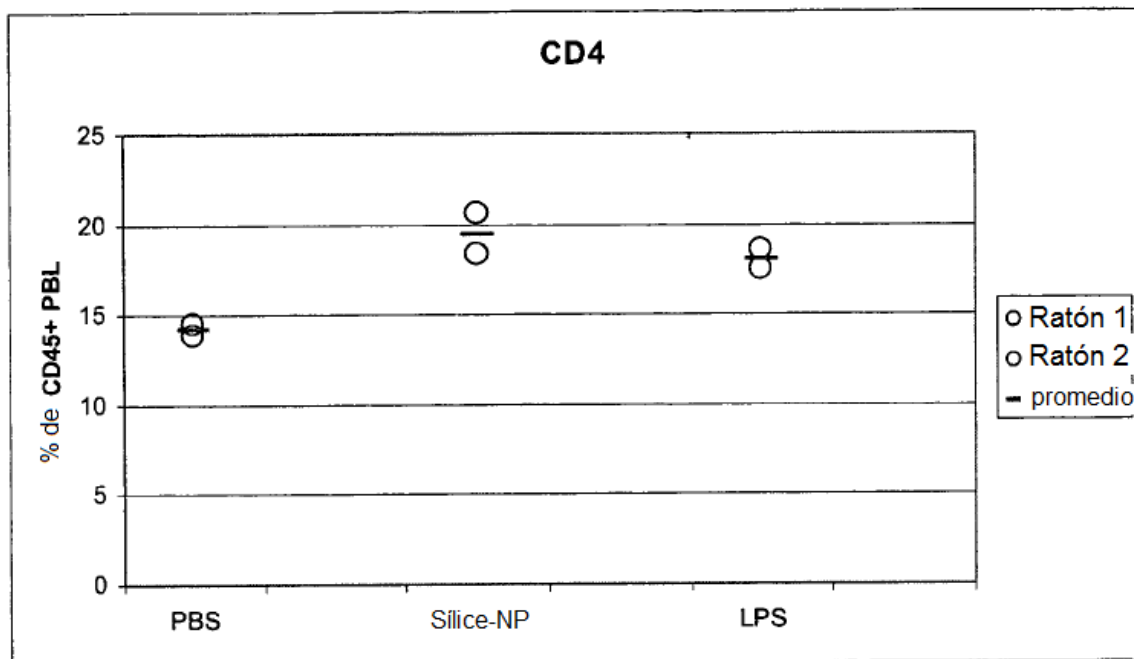


Figura 2a

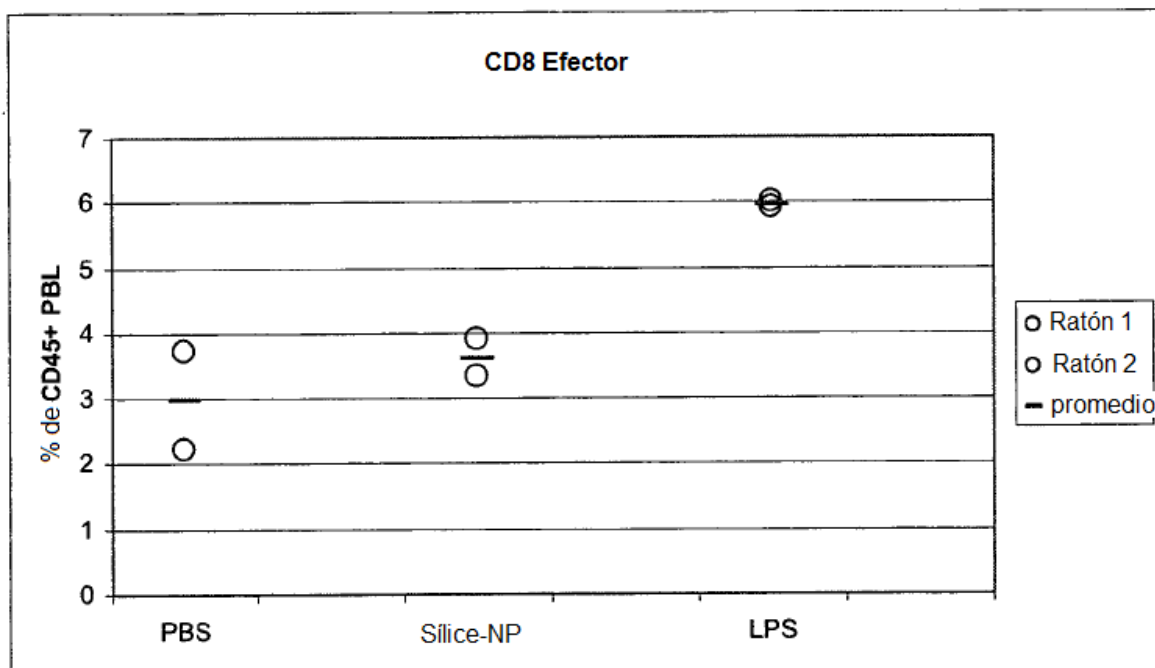


Figura 2b

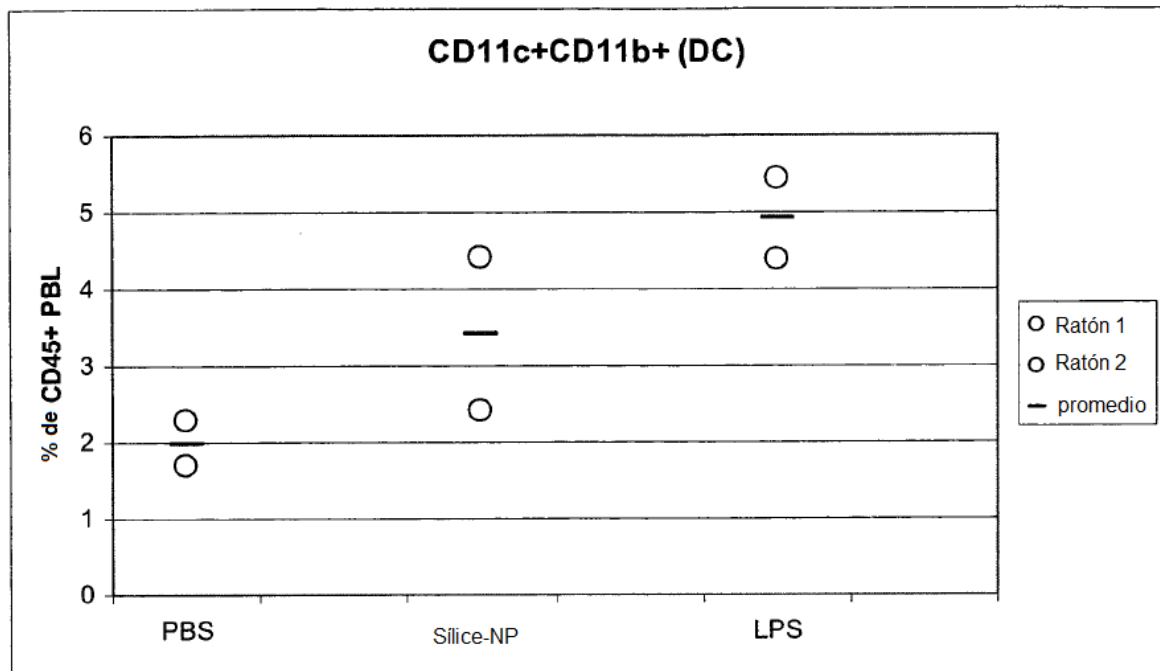


Figura 2c

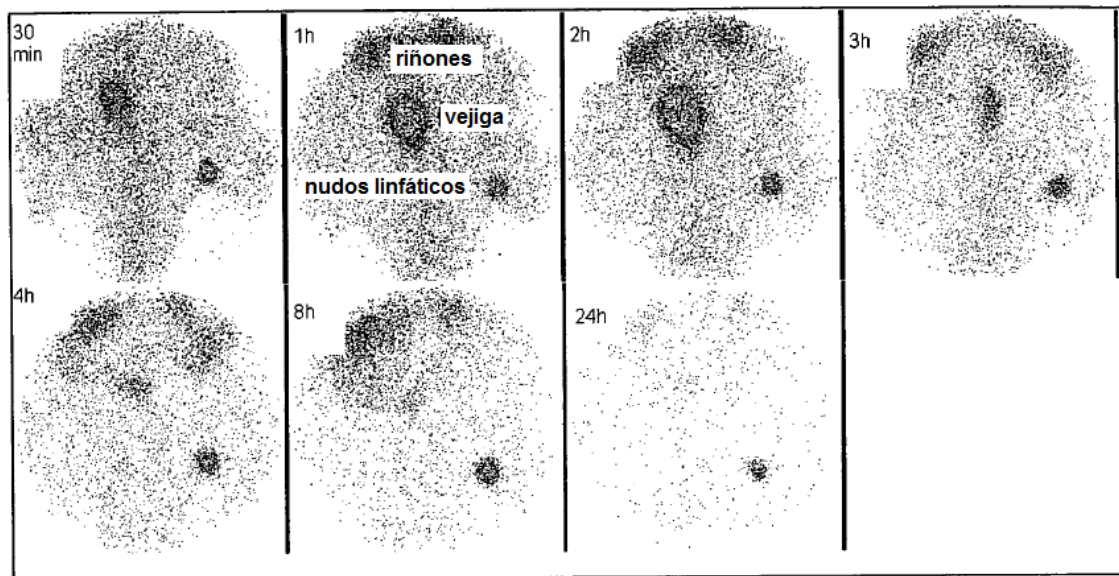


Figura 3