

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 528**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18	(2006.01)
H01F 1/00	(2006.01)
A61K 41/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01)
A61K 9/20	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2015 PCT/IB2015/050122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104664**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2015 E 15704370 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3092012**

54 Título: **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con catecol, producción y uso de las mismas**

30 Prioridad:

07.01.2014 IT FI20140003

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**COLOROBIA ITALIA S.P.A. (100.0%)
Via Pietramarina, 53
50059 Vinci FI - Frazione Sovigliana, IT**

72 Inventor/es:

**BALDI, GIOVANNI;
RAVAGLI, COSTANZA;
COMES FRANCHINI, MAURO;
D'ELIOS, MARIO MILCO;
BENAGIANO, MARISA y
BITOSI, MARCO**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 745 528 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 magnéticas funcionalizadas con catecol, producción y uso de las mismas

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo de las construcciones de nanopartículas funcionalizadas, su producción y su uso.

10 **Técnica anterior**

[0002] Como se conoce, la magnetita es un mineral con propiedades ferromagnéticas cuya fórmula química es Fe_3O_4 (a veces también escrita como $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$).

15 **[0003]** Es bien sabido que la magnetita en forma de nanopartículas, es decir, con dimensiones que van desde unos pocos nanómetros hasta unas pocas decenas, si se sumerge en un campo magnético variable en el *intervalo* de ondas de radio, interacciona con el campo electromagnético y, después, libera energía térmica a lo que lo rodea, dando lugar a lo que se llama efecto hipertérmico o hipertermia magnética.

20 **[0004]** En oncología, la hipertermia se explota para mejorar la eficacia de la quimioterapia o la radioterapia; de hecho, elevar la temperatura de un tumor sólido entre 41 y 45 °C induce la apoptosis de las células tumorales; en general, esto se aplica por medio de lavados con líquidos llevados a las temperaturas apropiadas y circulados en las proximidades de los sitios afectados por las masas tumorales.

25 **[0005]** Recientemente, se adoptan antenas que, insertadas directamente en la masa tumoral, generan microondas y así interaccionan con las moléculas dipolares del agua, generando hipertermia.

30 **[0006]** Estos tratamientos son generalmente extremadamente invasivos y de baja eficacia (en el primer caso) y no carecen de posibles efectos secundarios negativos, tal como el riesgo de metástasis, necrosis tisular, etc. en el segundo caso.

35 **[0007]** Usando nanopartículas magnéticas que llegan a la vecindad inmediata de los tejidos tumorales o, preferentemente, que penetran en las células cancerosas, es posible superar los problemas anteriores y lograr una alta eficiencia del efecto hipertérmico, localizándolo a nivel celular.

40 **[0008]** Específicamente enviando nanoestructuras en las células tumorales de tumores sólidos o en tejidos o sitios patológicos, tales como las placas de amiloide de Alzheimer o en los tejidos dañados de esclerosis múltiple, así es posible transmitir, de manera eficiente y libre de efectos secundarios, múltiples tratamientos conjugados, tales como los hipertérmicos y los farmacológicos.

45 **[0009]** En la literatura hay muchos ejemplos de nanopartículas híbridas de polímero inorgánico o proteínas que comprenden un núcleo biocompatible de magnetita de nanopartículas y un recubrimiento, ya sea polímero o proteína, posiblemente cargadas de fármacos y funcionalizadas en la superficie, con agentes de direccionamiento adecuados.

50 **[0010]** Estas nanopartículas son potenciales agentes teranósticos en los que la capacidad de generar calor bajo el efecto de un campo electromagnético EM (efecto hipertérmico), la posibilidad de administración de fármacos (AF) y la capacidad de ser identificados durante su acción con técnicas de imagen (MRI) se combinan sinérgicamente.

55 **[0011]** La solicitud de patente internacional WO 2004/071386 describe compuestos que consisten en microcápsulas liposomales mono o bilamelares que contienen una nanopartícula magnética y una molécula biológicamente activa que tiene el objetivo principal de alcanzar y tratar tumores hepáticos.

60 **[0012]** La solicitud de patente internacional WO 2011/147926 desvela composiciones vesiculares con respuesta magnética que comprenden (a) una estructura vesicular que tiene una membrana que encierra una cavidad y (b) al menos una nanopartícula magnética estabilizada incluida en dicha membrana, así como los métodos de preparación y uso de dichas composiciones vesiculares en la administración de un agente activo, como un nanorreactor, con fines de imagen y sus combinaciones.

65 **[0013]** La solicitud de patente internacional WO 2012/177039 desvela un agente de contraste para la obtención de imágenes con contraste del ganglio linfático, que incluye nanopartículas de óxido de hierro dispersas y estabilizadas en un medio acuoso por un copolímero mimético de proteína adhesiva de mejillón, un método para linfografía con contraste usando dicho agente de contraste y un método para el diagnóstico de cánceres de ganglios linfáticos usando dicho agente de contraste.

[0014] La solicitud de patente US 2012/0237605 desvela nanopartículas que incluyen un núcleo metálico de oro,

plata u óxido de hierro que tiene una longitud a lo largo de cada eje de 1 a 100 nanómetros (nanorod) y un recubrimiento que comprende polidopamina dispuesta en al menos parte de la superficie del núcleo metálico, junto con métodos para fabricar y usar tales nanopartículas. Las nanopartículas se describen para su uso en el tratamiento del cáncer o infecciones bacterianas, y para su uso en el diagnóstico por imagen.

5 [0015] El artículo "Preparation and *in vitro* evaluation of doxorubicin-loaded Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers", Soudabeh Davaran et al., International Journal of Nanomedicine (2012) vol. 7, páginas 511-526, describe el óxido de hierro superparamagnético y el medicamento contra el cáncer doxorubicina hidrocloreuro encapsulado en nanopartículas de poli(ácido D, L-láctico-co-glicólico) poli(etilenglicol) (PLGA-PEG) para el tratamiento local.

10 [0016] El artículo "Promising iron oxide-based magnetic nanoparticles in biomedical engineering", Phuong Ha-Lien Tran et al., Archives of Pharmacal Research, diciembre de 2012, 35 (12), páginas 2045-2061, es un artículo de revisión sobre nanopartículas magnéticas a base de óxido de hierro y sus aplicaciones biomédicas.

15 [0017] En la patente europea EP 1 979 365, el solicitante ha descrito construcciones que consisten en partículas magnéticas nanométricas funcionalizadas con moléculas bifuncionales en las que un extremo de dichas moléculas está unido a la superficie de la partícula magnética mientras que el otro está libre y, por lo tanto, puede reaccionar con unidades complejas, tales como biopolímeros, ciclodextrinas, anticuerpos y fármacos para su uso en el campo farmacéutico y diagnóstico, permitiendo obtener complejos de nanopartículas/aglutinantes en los que se produce un recubrimiento total y compacto de la nanopartícula sin alteraciones significativas de las propiedades que dependen de ella (por ejemplo, propiedades ópticas o magnéticas).

20 [0018] La patente posterior EP 2 117 600 describe construcciones en las que las partículas funcionalizadas similares a las descritas en la patente anterior EP 1 979 365 están recubiertas con polímeros en los que posiblemente se ha dispersado una molécula que tiene propiedades farmacológicas.

25 [0019] Asimismo, la solicitud de patente europea 2 512 992 (a nombre del mismo solicitante) describe procesos de síntesis de poliol que permiten obtener fácilmente nanopartículas de magnetita con un tamaño uniforme y controlado (que, por lo tanto, tienen una alta eficiencia hipertérmica).

30 [0020] Como se puede observar, por lo tanto, se han sugerido muchas soluciones en la literatura para la solución del problema de dirigir selectivamente dentro del cuerpo partículas capaces de realizar una acción terapéutica tanto mediante la aplicación de hipertermia sola o en combinación con fármacos tradicionales; sin embargo, los productos conocidos no satisfacen completamente las necesidades de la solicitud para lograr un tratamiento efectivo de tumores y otras enfermedades con nanoestructuras debido a varios problemas que aún no se han superado. El primer problema es la especificidad de la nanoestructura, de hecho, se sabe por la literatura que las partículas híbridas de polímero inorgánico/proteína se eliminan rápidamente del sistema reticuloendotelial cuando se administran por vía sistémica (células reticulares, macrófagos, células de Kupffer).

35 [0021] Por lo tanto, la eliminación de las nanoestructuras es responsable de la ineficiencia de un tratamiento nanoteranóstico a nivel sistémico; se han realizado numerosos intentos para superar esta dificultad, incluida la funcionalización de la superficie de polímero/proteína de nanopartículas con unidades de administración tales como anticuerpos monoclonales, péptidos y moléculas activas (tales como azúcares, etc.) pero también en este caso, la mayoría de las partículas son eliminadas por el sistema reticuloendotelial y solo una pequeña cantidad llega a los sitios afectados, el tejido tumoral y las células cancerosas.

40 [0022] Un segundo problema, una consecuencia del primero, es que la cantidad de partículas magnéticas que llegan al tumor o al tejido patológico puede resultar insuficiente para llevar a cabo un efecto hipertérmico eficiente.

45 [0023] Por último, los sistemas nanoteranósticos actuales tienen poca estabilidad en los fluidos biológicos y, por lo tanto, tienden a formar grandes agregados (hasta más de 500-1000 nm) que es poco probable que penetren en la masa tumoral o vayan más allá de una barrera hematoencefálica intacta, lo que empeora el direccionamiento específico de estos sistemas en las células objetivo, limitando aún más la eficiencia del tratamiento.

50 [0024] De la literatura se sabe que los linfocitos T dentro del sistema inmunitario son los principales protagonistas de las respuestas antitumorales.

55 [0025] Son capaces de reconocer selectivamente las células tumorales debido a su receptor específico, llamado TCR. La activación de los linfocitos T por el péptido antigénico tumoral respectivo puede ocurrir solo si el antígeno es presentado por las células representadas por monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, microglía o también linfocitos B.

60 [0026] Para una activación efectiva de los linfocitos T, también se requieren señales de membrana y señales solubles además del antígeno. Entre las señales solubles, el factor de activación más potente es la interleucina 2 (IL-2), mientras que entre las señales de membrana, la más potente es la molécula B7.

[0027] Una vez que se identifica el tumor, es destruido por los linfocitos a través de varios mecanismos, entre los cuales los principales son: la maquinaria citotóxica ligada a la perforina y la ligada al ligando Fas.

5 **[0028]** El melanoma fue uno de los primeros tumores en asociarse con una fuerte respuesta inmunitaria local mediada por linfocitos T y a lo largo de los años ha sido posible demostrar que una respuesta de linfocitos T fuerte está relacionada con un mejor pronóstico. Mediante el uso de nanopartículas, es posible desarrollar una nueva estrategia anticancerosa personalizada basada en el uso de linfocitos T especializados en matar un tumor, armados por nanopartículas, listos para golpear al tumor, después de la activación por láser/campos electromagnéticos.

10 **[0029]** Por otra parte, la literatura describe ampliamente el papel desempeñado por el sistema inmunitario y, en particular, por los linfocitos y las células inflamatorias, en enfermedades del sistema nervioso, tal como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer.

15 **[0030]** La esclerosis múltiple es, de hecho, el prototipo de enfermedades autoinmunes en la patogenia de la cual los linfocitos T desempeñan un papel crucial (Elliot M. Frohman, M.D., Michael K. Racke, M.D. y Cedric S. Raine, N Engl J Med 2006; 354:942-955). En particular, los linfocitos T-colaboradores capaces de producir citocinas inflamatorias importantes, tales como interferón gamma y linfotóxina, denominados linfocitos T-colaboradores 1 (Th1), pero también linfocitos T CD8, linfocitos B y células inmunitarias de la línea de monocitos, son muy importantes. También en la enfermedad de Alzheimer (Henry W. Querfurth y Frank M. LaFeria, N Engl J Med 2010; 362:329-344), los mecanismos inflamatorios relacionados con la producción de interleucina 1, interleucina 6, factor α de necrosis tumoral, por microglía y astrocitos, debido a las proteínas amiloides, desempeñan un importante papel patogénico; por lo tanto, las nanopartículas según la invención pueden desempeñar un papel importante también en el tratamiento de estas enfermedades.

25

Breve descripción de las figuras

[0031]

30 La figura 1 muestra, tomada con un microscopio de exploración de pistola de emisión de campo en modo STEM, la típica formación de grupos tomada por las nanopartículas según la invención dentro de una matriz polimérica.

La figura 2 muestra una construcción de mezcla de partículas magnéticas y nanorods de oro.

La figura 3 muestra esquemáticamente un modelo de construcción que consiste en nanopartículas de magnetita o nanorods de magnetita y de oro y recubiertas con polímeros de bloque PLGA-*b*-PEG-COOH.

35 La figura 4 muestra el diseño del proceso de preparación paso a paso de la construcción nanoestructurada de acuerdo con la invención.

La figura 5 muestra el diseño del proceso para la purificación y selección de linfocitos.

La figura 6 muestra una imagen tomada con un microscopio óptico de monocitos/macrófagos cargados con construcciones de nanopartículas según la invención.

40 Las figuras 7 y 8 muestran la RMN de ¹H del polímero PLGA-NHS conjugado con NH₂-PEG-COOH.

La figura 9 muestra el espectro UV-Vis de un producto según la invención.

La figura 10 muestra una prueba de BCA en un producto según la invención.

Sumario de la invención

45

[0032] Se describe una construcción que comprende una pluralidad de nanopartículas magnéticas cuya superficie está funcionalizada con catecol que tiene los grupos polares OH adheridos a la superficie de las partículas y la parte final, no unida a la superficie de la partícula, que presenta reactividad hidrofóbica, encapsulada en una matriz de polímero biocompatible, en la que una molécula con acción terapéutica está opcionalmente dispersa, estando a su vez dicha matriz polimérica opcionalmente funcionalizada. Sorprendentemente se descubrió que dichas construcciones poliméricas pueden incorporarse en las células del sistema inmunitario dando lugar a la ingeniería de las mismas.

50

Descripción detallada de la invención

55

[0033] Ahora se ha descubierto sorprendentemente que las construcciones que comprenden una pluralidad de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con catecol encapsuladas en una matriz de polímero biocompatible pueden superar los problemas anteriores, asegurando la estabilidad necesaria en medios fisiológicos y en sangre humana.

60

[0034] Por otra parte, las características estructurales de estas construcciones ayudan a garantizar un efecto hipertérmico implementado en comparación con el mostrado por los núcleos inorgánicos monodispersos descritos en las patentes anteriores; esta ventaja se debe a la denominada "estructura de agrupamiento" (véase la Figura 1) de las partículas magnéticas que tienden a combinarse en centros estructurales de múltiples partículas dentro de la matriz polimérica, llevando a cabo un efecto sinérgico sobre las propiedades hipertérmicas.

65

[0035] La funcionalización de las partículas magnéticas con catecol, de acuerdo con la invención, es esencial para que se produzca la estructura de agrupamiento anterior y, por lo tanto, permite obtener construcciones muy superiores a las conocidas en la técnica anterior en cuanto a propiedades hipertérmicas y estabilidad a lo largo del tiempo.

5

[0036] Entre las partículas magnéticas, se prefiere especialmente la magnetita. Si lo prefiere, las construcciones según la invención pueden tener, además de las nanopartículas magnéticas como se ha descrito anteriormente, una pluralidad de nanorods de oro (véase la Figura 2).

[0037] La presencia de nanorods permite un efecto hipertérmico considerable al aplicar una radiación láser infrarroja como la generada por los láseres de CO₂, lo que aumenta aún más el efecto hipertérmico impartido por las estructuras de agrupación de magnetita.

[0038] Esto permite un sistema combinado de láser y ondas de radio que utiliza láser para distritos de superficie o aquellos a los que se puede llegar a través de la sonda y las ondas de radio para distritos profundos.

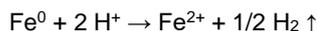
[0039] Las nanopartículas magnéticas se pueden preparar mediante el proceso de poliol conocido como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente europea 2 512 992 anterior que describe un proceso de preparación en el que:

20

- i) se prepara una solución de poliol de Fe^{III} a partir de Fe⁰;
- ii) las nanopartículas de magnetita se preparan en las condiciones de síntesis de poliol.

[0040] La etapa anterior (i) es la reacción bien conocida y descrita de ataque ácido (también ácidos débiles, tales como ácido acético) sobre el hierro de acuerdo con la ecuación:

25



[0041] Después, es posible oxidar por completo la solución de Fe^{II} en polioles a Fe^{III} (por ejemplo, acetato) a través del lavado con aire y la adición de H₂O₂ en el entorno de reacción a una temperatura de menos de 100 °C.

30

[0042] Los nanorods de oro se preparan de manera conocida con una síntesis asistida por microondas a partir de oro en forma iónica en presencia de varios aditivos: bromuro de alquiltrimetilamonio, CnTAB n = 10-16, cloruro de cetilpiridinio, C16 PC y PVP [a este respecto, véase M. Tsuji, K. Matsumoto, T. Tsuji, H. Kawazumid, Mater. Lett. 59 (2005) 3856] o por reducción de HAuCl₄ con ácido ascórbico en presencia de CTAB y AgNO₃ (a este respecto, véase Ratto F. et al. J NANOPARTICLE RESEARCH 2010 y /Ratto F. et al. J NANOPARTICLE RESEARCH 2012)

35

[0043] Las superficies de las partículas magnéticas y/o magneto-ópticas obtenidas como se ha descrito anteriormente se funcionalizan con catecol (grupo bifuncional) explotando la afinidad de los grupos polares OH a la superficie de las partículas y permitiendo que la parte final no se una a la superficie de la partícula para mantener una reactividad hidrófoba adecuada para la posterior incorporación en una matriz de polímero/proteína.

40

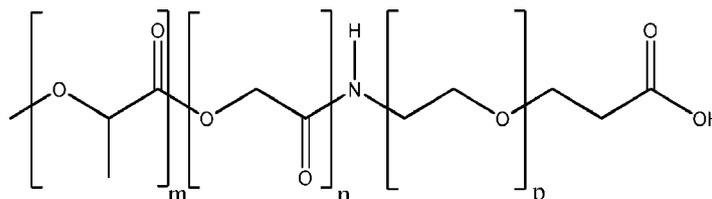
[0044] Se entiende que la matriz polimérica según la presente invención consiste en copolímeros biodegradables y, por lo tanto, es capaz de permitir la liberación del fármaco, que debe proceder gradualmente a medida que la matriz se degrada en un entorno fisiológico.

45

[0045] Los ejemplos de copolímeros adecuados para este fin son: nanomicelas biodegradables, poliésteres, poliésteres, poliuretanos, policarbonatos y ácido poli(glutámico), polieteramina y polibencilglutamato.

[0046] Particularmente preferidas son las nanomicelas biodegradables, que consisten en copolímeros de bloque de ácido poli(láctico-co-glicólico) y polietilenglicol carboxilato (PLGA-*b*-PEG-COOH, intervalo MnPLGA = 44-10 kDa, MnPEG = 2-3 kDa) que tiene la fórmula (I)

50



(I)

55

en la que m = [117-330]; n = [117-330]; p = [60-100],

[0047] Este producto es conocido y ya se ha empleado en varios otros trabajos de Administración de fármaco también a nivel de Fase clínica I para la prueba de agentes anticancerosos (véase X. Shuai et al, 2004 y X. Shuai, H. Ai, N. Nasonkla, S. Kim, J. Geo, J. Controlled Release, 2004, 98, 415).

5 **[0048]** De hecho, el polímero tiene características que permiten ensamblar sistemas nanoesféricos con un área interna hidrófoba, garantizado por los residuos de PLGA y un área externa hidrófila impartida por los terminales de PEG-COOH (véase la Figura 3).

10 **[0049]** Esta característica dual permite que las nanoesferas atrapen los principios activos orgánicos en la parte hidrofóbica y se dispersen en solución acuosa gracias a la parte hidrofílica.

[0050] Si se desea, el polímero se puede mezclar con moléculas que tienen una acción terapéutica que se dispersa en la matriz polimérica de acuerdo con procesos conocidos y como se ilustra en los ejemplos dados a continuación.

15 **[0051]** Los ejemplos de moléculas con acción terapéutica según la invención son, por ejemplo, fármacos anticancerosos (taxanos, gemcitabina, vincristina, etc.), secuestrantes de peroxinitrito, inhibidores de la superóxido dismutasa, retinoides (bexaroteno), citocinas, tales como interleucina 10, ligandos del TLR, tal como la molécula HP-NAP capaz de activar el TLR2, aspirina.

20 **[0052]** Además, la funcionalidad del ácido carboxílico del fragmento PEG-COOH de las micelas permite un enlace químico estable con anticuerpos monoclonales, proteínas, péptidos o moléculas activas de interés (por ejemplo, y/o colorantes fluorescentes) para el reconocimiento específico por las sobreexpresiones celulares.

25 **[0053]** Entre los anticuerpos útiles para la funcionalización según la invención podemos mencionar hERG, hEGFR, IgG, moAb, etc.

[0054] Los ejemplos (véase el ejemplo 10) describen la funcionalización anterior, en particular usando un anticuerpo monoclonal específico hERG1 descrito y reivindicado en la patente italiana IT 1.367.861.

30 **[0055]** En particular, es un anticuerpo monoclonal específico contra la porción extracelular del poro S5 de la proteína HERG1 producida por un hibridoma que comprende el producto de una fusión entre una célula inmortalizada, perteneciente a la línea celular neoplásica murina NSO, y un linfocito obtenido por inmunización de un ratón con un péptido de secuencia EQPHMDSRIGWLHN.

35 **[0056]** La construcción según la invención (en lo sucesivo, también denominada "nanobiorreactor" o "NBR") que contiene nanopartículas magnéticas funcionalizadas con catecol se prepara llevando a cabo una nanoprecipitación, en la que dos fluidos:

- 40 - una solución orgánica de polímero disuelto en un disolvente, mezclada con la suspensión de nanopartículas recubiertas con aglutinante orgánico, ambos en el mismo disolvente,
y
- una solución acuosa de Na₂HPO₄ 1 mM

45 se mezclan en un flujo constante en una célula de mezcla con síntesis *discontinua* o *continua*. Para la síntesis *discontinua*, la suspensión orgánica que contiene polímero y partículas se inyecta con una jeringa en la solución acuosa, sin agitación magnética, en una sola etapa.

50 **[0057]** Para la síntesis continua, se prepara un sistema de bomba peristáltica doble para llevar a cabo la adición de la solución orgánica a la corriente acuosa (relación orgánica volumen/agua 1/10). Los tubos respectivos extraen la solución directamente de los pulmones que contienen la suspensión orgánica (con partículas funcionalizadas y polímero) y la solución de Na₂HPO₄ 1 mM (pH 7,4).

55 **[0058]** Una vez que se ha obtenido la dispersión de partículas híbridas (que consiste en construcciones de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con catecol incluidas en el polímero), parte del disolvente orgánico se elimina *mediante* un evaporador rotatorio para minimizar la cantidad de fase orgánica en las etapas de producción posteriores.

60 **[0059]** A continuación, la suspensión se dializa contra una solución acuosa de Na₂HPO₄ para la eliminación de la fase orgánica y se concentra al volumen mínimo posible para obtener una concentración de 0,1 a 1 % p/p.

65 **[0060]** A través de una segunda concentración, es posible obtener un producto mucho más concentrado a través de diálisis de membrana con un factor de concentración teórico que varía de 5x a 20x dependiendo del uso. A continuación, el producto se filtra con un filtro a 0,22 µm para eliminar la carga bacteriana. El producto tiene una excelente eficiencia hipertérmica si se irradia durante 30 minutos con un campo magnético alterno de 21-24 kA/m y una frecuencia de 160-190 kHz, su temperatura aumenta al menos 5 °C.

- [0061]** El método descrito en el presente documento permite la preparación de construcciones con una distribución dimensional centrada en un intervalo de 30 a 60 nm.
- 5 **[0062]** El potencial ξ del producto así obtenido (Malvern Zetasizer nano-S), medido para tener información sobre la estabilidad electrostática de la suspensión y su fuerza iónica, es inferior a -30 mV, lo que significa que las partículas se ven afectadas por la repulsión electrostática de superficie negativa producida por los grupos carboxílicos que a pH (fisiológico) 7,4 están parcialmente desprotonados.
- 10 **[0063]** Las condiciones experimentales descritas anteriormente permiten hacer una suspensión con buena estabilidad después de la dilución en medios de cultivo típicamente utilizados para cultivos celulares (DMEM, RPMI), exhibiendo poca tendencia a la agregación y sedimentación también después de un cambio claro en las condiciones de fuerza iónica debido a la dilución.
- 15 **[0064]** La obtención del producto funcionalizado en la superficie con anticuerpos monoclonales y/o colorantes fluorescentes (por ejemplo, Cyanine®, Dylight®, etc.) para una administración dirigida y para su uso en técnicas de imagen requiere el uso de NBR como precursor antes de ser sometido al segundo proceso de concentración (véase anteriormente).
- 20 **[0065]** Normalmente, en este momento, el producto tiene una concentración de aproximadamente 0,05-0,1 % en peso de material inorgánico.
- 25 **[0066]** La etapa preliminar del proceso proporciona la activación de los grupos carboxilo finales del polímero, expuestos hacia la parte externa de la construcción, en contacto con la fase polar, con activadores tales como EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocioruro] (relación molar EDAC/COOH = 10/1) y sulfo-NHS (NHS/COOH = 1/1), para promover el ataque posterior por esterificación de los grupos amino finales del anticuerpo monoclonal y/o del colorante fluorescente.
- 30 **[0067]** En el caso de colorantes fluorescentes con emisión a λ 600 - 800 nm (adecuado para aplicaciones de imágenes NIR *in vivo*), dado que solo las moléculas de NHS-éster terminales están disponibles en el mercado, es necesario proporcionar una etapa intermedia en la que se añade un conector diamino-terminal para el enlace puente, por un lado con el colorante fluorescente, y, por el otro, con los grupos carboxílicos del polímero activado.
- 35 **[0068]** Una vez que se ha activado la superficie de las construcciones, se añade el anticuerpo y/o la solución de colorante amino terminal y se deja reposar.
- [0069]** A continuación, la suspensión se concentra y se dializa contra Na_2HPO_4 acuoso y se concentra hasta 0,2 - 1,0 % en peso de la fase inorgánica, dependiendo del uso.
- 40 **[0070]** A continuación, el producto se filtra con un filtro a 0,22 μm para eliminar la carga bacteriana. El método descrito en el presente documento permite la preparación de construcciones con una distribución dimensional centrada en un intervalo de 40 a 70 nm.
- 45 **[0071]** El potencial ξ del producto así obtenido (Malvern Zetasizer nano-S), medido para tener información sobre la estabilidad electrostática de la suspensión y su fuerza iónica, es inferior a -30 mV, pero mayor que el medido en el producto NBR, lo que significa que la carga negativa ejercida por los grupos carboxílicos del producto bruto se neutraliza en parte por el anticuerpo/colorante unido.
- 50 **[0072]** El contenido del anticuerpo unido a las partículas se analiza mediante la prueba BCA®: después de la adición de reactivos adecuados a la solución que contiene el analito de proteína, se desarrolla un complejo de Cu^{2+} cuya coloración a 562 nm se observa con análisis espectral y de la cual se deriva la concentración de anticuerpo usando una calibración lineal.
- 55 **[0073]** Con el procedimiento descrito en el presente documento es posible, por ejemplo, producir construcciones de nanopartículas funcionalizadas con moAb, con porcentaje de ataque del moAb entre 5 y 30 % en peso en comparación con el contenido de la fase inorgánica.
- 60 **[0074]** La producción del sistema nanobiorreactor/fármaco lipofílico (en adelante, NBR_PTX) y nanobiorreactor/anticuerpo/fármaco lipofílico (NBR_hERG_PTX) (donde el fármaco lipofílico, por ejemplo, es Paclitaxel) es exactamente el mismo que el proceso de síntesis del nanobiorreactor como se ha descubierto anteriormente y, por lo tanto, proporciona para la encapsulación de las construcciones de nanopartículas inorgánicas, previamente funcionalizadas con catecol, dentro de una matriz polimérica basada en PLGA-*b*-PEG-COOH. La única variación de este proceso proporciona la disolución de la cantidad específica de fármaco dentro del polímero y la suspensión de las construcciones funcionalizadas de nanopartículas.
- 65 **[0075]** A continuación, el nanobiorreactor cargado con paclitaxel (NBR_PTX) se obtiene utilizando el método de

nanoprecipitación, donde la solución orgánica mencionada anteriormente se añade enérgicamente a la solución acuosa de Na_2HPO_4 1 mM dentro de una celda de mezcla. No hay cambios en las propiedades morfológicas de la suspensión de una síntesis discontinua a una continua. Los procesos de purificación, filtración y concentración aplicados son los mismos que los descritos anteriormente.

5 **[0076]** Para la caracterización del producto, además de la determinación del diámetro promedio de partícula, su potencial ξ y la concentración de la fase inorgánica, la cantidad de principio activo encapsulado también se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

10 **[0077]** El producto así obtenido y caracterizado se puede funcionalizar adicionalmente en la superficie con unidades de direccionamiento tales como (hEGR, hEGFR, IgG, ...).

[0078] El proceso configurado para este fin sigue con precisión el procedimiento de selección del nanobiorreactor NBR_moAb como se ha descrito anteriormente.

15 **[0079]** De hecho, proporciona una etapa preliminar de activación de los grupos carboxilo presentes en el polímero, con activadores, tales como EDAC y sulfo-NHS, y una etapa de reacción con el anticuerpo monoclonal, todo de acuerdo con las mismas proporciones establecidas en el proceso descrito anteriormente para NBR_moAb.

20 **[0080]** A continuación se realizan los procesos habituales de purificación y caracterización. Las suspensiones de construcción así obtenidas se caracterizan por un diámetro hidrodinámico medio de entre 45 y 55 nm, mientras que el potencial ξ está muy por debajo de -30 mV. De acuerdo con una realización adicional de la invención, las construcciones como se han definido anteriormente, como alternativa a la decoración con proteínas o con anticuerpos, pueden incorporarse a las células del sistema inmunitario.

25 **[0081]** Sorprendentemente, las construcciones comprenden grupos de partículas de magnetita funcionalizadas con catecol y recubiertas con copolímeros de bloque de ácido poli (láctico-co-glicólico) y carboxilato de polietilenglicol (PLGA-*b*-PEG-COOH, intervalo Mn-PLGA = 44-10 kDa, MnPEG = 2-3 kDa) como se ha descrito anteriormente, son fácilmente incorporadas por las células del sistema inmunitario sin comprometer su funcionalidad y vitalidad.

30 **[0082]** Una vez que las células del sistema inmunitario se diseñan con la introducción de las construcciones de acuerdo con la invención, estas pueden usarse para el diagnóstico de enfermedades tumorales, enfermedades degenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), del sistema nervioso central, enfermedades cardiovasculares e infecciosas cerebrales, trasplantes, enfermedades autoinmunes y también para la terapia de tumores, enfermedades cardiovasculares cerebrales, enfermedades degenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), enfermedades infecciosas, trasplantes, cirrosis hepática y otras afecciones que implican fibrogénesis, enfermedades caracterizadas por abortos múltiples, muerte fetal intrauterina, enfermedades neonatales, trastornos de la coagulación congénitos y adquiridos, enfermedades genéticas, enfermedades autoinmunes y, finalmente, para el alivio del dolor.

40 **[0083]** La inducción de la liberación puede realizarse con diferentes métodos, tales como el antígeno específico (por ejemplo, MAGE-3 en el caso del tratamiento del melanoma, MOG o antígenos de mielina en el tratamiento de la esclerosis múltiple, etc.) o con sustancias inmunomoduladoras apropiadas, tales como IL-2, ligando CD40, agonistas de TLR, liposomas, complejos inmunoestimulantes (ISCOMS).

45 **[0084]** Cabe destacar, de hecho, que una propiedad importante de las células del sistema inmunitario está representada por su capacidad de llegar a casi todos los distritos del cuerpo, por lo tanto, su uso como vehículo para llegar a distritos específicos, llevando a través de la construcción de acuerdo con la invención el producto particular requerido al destino, supera la gran limitación actual de los nanoteranósticos representados por la baja especificidad del tratamiento.

50 **[0085]** Las células del sistema inmunitario útiles para el propósito anterior se seleccionan, por ejemplo, de: linfocitos T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos B, granulocitos neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, células gamma delta.

55 **[0086]** Las células se toman del paciente individual, se cargan con la construcción deseada y, a continuación, se reintroducen en el mismo paciente por vía tópica o sistémica.

60 **[0087]** Las células del sistema inmunitario serán purificadas, como se describe a continuación, y para facilitar la selección selectiva/preferencial de los distritos corporales afectados por la enfermedad en cuestión, las células pueden tratarse *ex vivo* con antígenos relevantes (o alérgenos), fármacos inmunomoduladores o se diseñan con moléculas inmunopotenciadoras o inmunosupresoras.

65 **[0088]** Una de las formas de seleccionar los linfocitos T para fines de diagnóstico o terapéuticos es enriquecer el número de linfocitos T específicos para un antígeno particular que puede ser un antígeno tumoral como se ha descrito anteriormente.

[0089] Los linfocitos, diseñados adecuadamente con las construcciones de la invención, pueden, una vez en su lugar, liberar las partículas por medio de estímulos químicos adecuados, las partículas pueden después, bajo irradiación de campos electromagnéticos en el intervalo de ondas de radio, ejercer hipertermia o liberar principios activos, tales como medicamentos antitumorales, secuestrantes de moléculas activas en el estrés oxidativo de los tejidos cerebrales, moléculas antiinflamatorias, etc. Las construcciones aún pueden realizar sus funciones incluso si permanecen confinadas dentro de los propios linfocitos.

[0090] Las construcciones magnéticas también pueden realizar la función de imagen de resonancia magnética, siendo excelentes medios de contraste T2 T2 * (véanse las patentes anteriores), las construcciones que contienen nanorods de oro pueden usarse en la terapia antitumoral mediada por láser e identificarse por métodos del tipo de espectrometría fotoacústica.

Purificación y selección de linfocitos

[0091] Los linfocitos T para su uso contra tumores se purifican de la sangre periférica o del sitio del tumor o de los ganglios linfáticos del paciente después de la administración previa de los antígenos tumorales relevantes o de otros distritos del cuerpo según se considere relevante, utilizando métodos estandarizados y/o con la ayuda de métodos selectivos MACS® (Current Protocols in Immunology 2013; D'Elios et al J Immunol 1997; 158:962-967).

[0092] Para seleccionar los linfocitos T específicos para el tumor, los linfocitos T se colocan en cultivo con el antígeno tumoral relevante (por ejemplo, MAGE-3 para melanoma, a una concentración de 10 µg/ml) en medio RPMI completo durante cinco días. A continuación, se añade IL-2 humana recombinante cada tres días y, después, las células se cargarán con construcciones, se lavarán y, a continuación, se administrarán al paciente por vía tópica y/o sistémica.

[0093] Los linfocitos T para su uso como producto de diagnóstico, por ejemplo, para la esclerosis múltiple con tecnología de resonancia magnética, se seleccionan por su especificidad para los antígenos de mielina o MOG (10 µg/ml) u otros antígenos como preferentemente capaces de lograr las estructuras del SNC.

[0094] Con este fin, se cultivan con uno o más antígenos durante cinco días, después se expanden con IL-2 y, a continuación, se cargan con construcciones.

[0095] El mismo procedimiento puede usarse para otras enfermedades neurológicas, tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular y otras enfermedades cerebro-cardiovasculares utilizando antígenos relevantes apropiados.

[0096] Las células dendríticas (altamente eficientes por su capacidad de presentar el antígeno a los linfocitos T y, por lo tanto, muy capaces de activar los linfocitos T) se obtienen utilizando métodos estandarizados tradicionales y/o con la ayuda de métodos selectivos MACS® (Current Protocols in Immunology 2013; Codolo et al. Arthr Rheum 2008; 58:3609-17). Se incubarán durante 36-44 horas con el antígeno deseado, luego se cargarán con construcciones, se lavarán y se volverán a infundir al paciente con fines terapéuticos o de diagnóstico (véase el diseño del proceso en la Figura 5).

[0097] Las células asesinas naturales y/o los linfocitos gamma delta, con fuerte actividad citotóxica, se obtienen usando métodos estandarizados tradicionales y/o con la ayuda de métodos selectivos MACS® (Current Protocols in Immunology, 2013), luego se cargan con la construcción deseada y posiblemente con otros compuestos inmunomoduladores, se lavan y se reintroducen en el paciente para fines terapéuticos (por ejemplo, antitumoral) o también con fines de diagnóstico.

[0098] Los granulocitos neutrófilos se obtienen utilizando métodos estandarizados tradicionales y/o con la ayuda de métodos selectivos MACS® (Current Protocols in Immunology, 2013), luego se cargan con la construcción deseada, así como posiblemente con otros compuestos inmunomoduladores, se lavan y se reintroducen en el paciente para fines diagnósticos (por ejemplo, para identificar la presencia de focos de infección en el cuerpo que no puedan identificarse mediante otras técnicas) o también con fines terapéuticos. También se pueden seleccionar otros tipos de células para uso diagnóstico y/o terapéutico (tales como las células efectoras para su uso para la terapia de tumores, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, enfermedades degenerativas), tales como linfocitos B, eosinófilos, basófilos, que se obtienen utilizando métodos tradicionales estandarizados y/o con la ayuda de métodos selectivos MACS® (Current Protocols in Immunology 2013).

[0099] Luego se cargan con la construcción deseada o posiblemente con otros compuestos inmunomoduladores, se lavan y se reintroducen en el paciente. Las células inmunes cargadas con construcciones se pueden usar para mostrar con técnicas de imagen apropiadas los distritos corporales que son una ubicación de la enfermedad.

[0100] Los linfocitos T y las células Jurkat se llenan óptimamente con construcciones después de 4 horas. Los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células J774A.1 son capaces de incorporar las construcciones

con un método de acuerdo con la invención en el que los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células J774A.1 se cargan con las construcciones a una concentración de 0,05 % en un medio de cultivo específico adecuado (medio). Para formar el medio que contiene construcciones, las construcciones se dispensan primero y, a continuación, el medio de cultivo específico.

5

[0101] El medio consiste en:

DMEM COMPLETO 10 % de FBS

DMEM COMPLETO:

10

- DMEM RICO en Glucosa (DME/ALTA). (EUROCLONE) (código: ECB7501L)
 - L-GLUTAMINA, solución 200 mM (100X). (EUROCLONE) (código: ECB 3000D)
 - Solución de PENICILINA-ESTREPTOMICINA (100X). (ATCC) (código: 30-2300)
- 10 % de suero bovino fetal FBS: Suero bovino fetal, Apto. (Sigma-Aldrich) (código: F6178-100 ml)

15

Cuando sea necesario, se utilizará suero autólogo del paciente o medio en ausencia de suero en lugar de suero fetal bovino.

20

[0102] Los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células J774A.1 se cargan de manera óptima con construcciones después de 2 horas, pero el fenómeno de incorporación está activo después de 15' hasta 24 h.

[0103] La Figura 6 muestra una imagen tomada con un microscopio óptico de los monocitos/macrófagos cargados con construcciones.

25

[0104] La invención se comprenderá más y mejor a la luz de los ejemplos que se dan a continuación, también observando las Figuras 4 y 5 que resumen esquemáticamente las diversas etapas para la preparación de la construcción y la ingeniería de las células del sistema inmunitario.

Ejemplo 1

30

Preparación de acetato de hierro en dietilenglicol DEG

Reactivos:

35

[0105] 40 g de Fe (Fe <99 % <212 mm) igual a 0,716 mol; 800 g de agua; 800 g de CH₃COOH (80 %) igual a 10,67 mol; 46,64 g de agua oxigenada (30 %) igual a 0,41 mol; 0,12 g de HCl concentrado; DEG (dietilenglicol) 3.850 g.

Síntesis:

40

[0106] Hierro, la solución de ácido acético y agua y el ácido clorhídrico se cargaron en un matraz de 4 bocas de 5.000 ml bajo flujo de nitrógeno y la temperatura se llevó a 90 °C y se mantuvo durante 6 horas. El sistema se dejó enfriar en N₂ y la solución se filtró para eliminar el Fe no disuelto. El agua oxigenada se añade gota a gota a la solución transparente colocada en un matraz usando un gotero, manteniendo la temperatura a 35 °C durante 1 h, obteniendo una solución transparente igual a 1628,3 g que tiene un título de hierro de 2,40 % p/p. A continuación, se extrae el exceso de ácidos mediante una primera destilación al vacío a la T de 40 °C, una recirculación de la parte seca con agua y eliminación por destilación dos veces (dos lavados consecutivos) y una extracción final a la T de aproximadamente 50 °C. Se añaden 3.850 g de DEG al seco para llevar el título teórico de hierro al valor de 1,01 % p/p de Fe.

50

Ejemplo 2

Preparación de nanopartículas de Fe₃O₄ en dietilenglicol

55

Reactivos:

[0107] 1,50 g de Fe⁰ (Fe⁰ < 99 %, <212 mm) Fe⁰ = 0,179 mol; 150 g de DEG; 1,2 g de solución en DEG 1/10 HCl conc. 37 %; 300,00 g de FeAc₃ en DEG (1,01 % p/p de Fe^{III}).

60

[0108] El hierro metálico y el DEG se colocaron en un matraz de 4 bocas de 500 ml en N₂ y la temperatura se llevó a 150 °C. La solución en DEG de ácido clorhídrico se añadió al sistema y se dejó en agitación durante 5 minutos. A continuación se añade acetato de hierro en 10 partes alícuotas equivalentes, usando una jeringa, para asegurar el correcto crecimiento de las partículas, llevando la temperatura a 170 °C, la reacción termina en 24-36 horas.

65

[0109] El producto se dejó enfriar a 60 °C y se decantó en un vaso de precipitados, reteniendo magnéticamente el hierro metálico sin reaccionar y, a continuación, se filtró sobre una fibra de vidrio de 0,45 µm.

[0110] 450 g de una nanosuspensión de magnetita en dietilenglicol que tiene un título en Fe iónico igual a 0,91 % ± 0,05, que se expresa en Fe₃O₄ corresponde a 1,253 % ± 0,05. Se midió la hipertermia en esta muestra y los valores fueron como se muestran en la tabla

5

Muestra	Campo KA/m	Frecuencia KHz	T inicial (°C)	SAR _M
Fe ₃ O ₄ filtrado	24	168	29,4	350,0

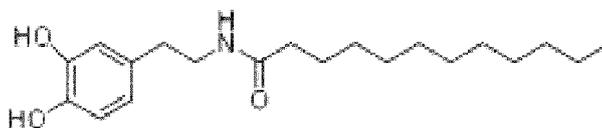
SAR_M: Tasa de absorción específica expresada en la masa de metal (Fe)

Ejemplo 3

10

Preparación de aglutinante orgánico N- (3,4dihidroxifenil) dodecanamida (DDA)

[0111]



15

PM = 335,48 g/mol

Reactivos:

20

[0112] 25 g de hidrocloreto de dopamina igual a 0,1318 mol; 1 l de THF; 45 ml de trietilamina 0,32 mol; 31,20 ml de cloruro de lauroilo 0,135 mol;

Purificación y cristalización

25

[0113] 400 ml de THF (Aldrich 401757-2L- Lote STBC4923V)
935 ml de acetato de etilo (Aldrich 34972-2,5L- Lote 57BC011AV)
315 ml de éter de petróleo (Aldrich 77379-2,5L- Lote BCBG7367V)

30 Síntesis:

[0114] A un matraz de 4 bocas de 5 l, clorhidrato de dopamina y, a continuación, THF (1 l) se colocan en atmósfera de nitrógeno y, después, se añade trietilamina, y el sistema se mantiene en agitación durante aproximadamente 20' para obtener una suspensión blanca.

35

[0115] A un matraz de 3 l con fondo plano, se añaden THF (1 l) y el agente de acilación. La solución se agita y se añade a los reactivos contenidos en el matraz de 5 l usando una bomba peristáltica a una velocidad de aproximadamente 2 ml/min durante 9 h, obteniendo una solución de color amarillo-naranja con algo de sólido blanco en el fondo.

40

Purificación:

[0116] A continuación, la fase orgánica que contiene el producto de síntesis se purifica y este último se recupera del subproducto formado durante la reacción. La purificación se lleva a cabo mediante la eliminación del disolvente mediante evaporador rotatorio con dos recirculaciones (2 x 200 ml). Por otro lado, en el residuo sólido y en las trazas residuales en los matraces de síntesis, la extracción acuosa y el tratamiento con acetato de etilo se llevan a cabo en un embudo de separación. Todas las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y, finalmente, se llevan a sequedad en un evaporador rotatorio. Se obtienen 57 g de producto aceitoso de color naranja.

45

50 Cristalización:

[0117] Se añaden al producto 450 ml de una mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo = 7:3. La suspensión se puso bajo agua fría y un sólido blanco comenzó a cristalizar. El sistema se dejó 1 día de reposo.

55

[0118] El sólido se filtró en un Buckner, se lavó con licor madre y se secó con una bomba de aceite. Se obtuvieron aproximadamente 39 g (44 g teóricos - rendimiento 88,6 %).

[0119] El licor madre resultante de la cristalización (2,45 g - sólido de color marrón anaranjado) y de los lavados se llevaron a sequedad (PRIME 27,13 g - sólido de color marrón oscuro).

60

Ejemplo 4

Funcionalización de la superficie de nanopartículas de Fe₃O₄ (en THF):

5 Reactivos:

[0120] 40,0 g de dispersión de Fe₃O₄ igual a $2,164 \cdot 10^{-3}$ mol; 1089 mg de DAA igual a $3,247 \cdot 10^{-3}$ mol; 120 ml de EtOH; 80,0 g de THF.

10 **[0121]** Se solubilizan 1089 mg de DDA en 120 ml de EtOH en un matraz de 250 ml; la solución así preparada se añade a magnetita con una jeringa de 60 ml. Luego se somete a ultrasonidos durante 1 h en un baño de ultrasonidos. La muestra se deja reposar durante unos minutos y, a continuación, se añaden 60 ml de H₂O y las construcciones se depositan en un imán de neodimio; el sobrenadante se separa y las nanopartículas se dispersan nuevamente en 80,0 g de THF. Se añaden 4 gotas de trietilamina a la dispersión (las partículas se dispersan después de aproximadamente diez minutos).

Caracterización

20 **[0122]**

DLS

MUESTRA	PDI	Z-prom.	Dv1	% V1
Fe ₃ O ₄ -DDA	0,142	34,9 (±0,4)	27,1 (±0,5)	100

Ejemplo 5

25 Funcionalización de la superficie de nanopartículas de Fe₃O₄ (en acetona):

Reactivos:

30 **[0123]** 4,0 g de dispersión de Fe₃O₄ igual a $0,2 \cdot 10^{-3}$ mol; 108,0 mg de DAA igual a $0,3 \cdot 10^{-3}$ mol; 12,0 ml de EtOH; 13,6 ml de acetona.

35 **[0124]** La suspensión de magnetita se somete a ultrasonidos en un baño ultrasónico durante 1 h, luego se añade a una solución de 108 mg de DDA en 12,0 ml de EtOH con una jeringa de 25 ml. A continuación, se coloca en ultrasonidos durante 30 min. La muestra se deja reposar unos minutos. Se añaden 6 ml de H₂O y las construcciones se sedimentan en un imán de neodimio, después, se separa el sobrenadante y las construcciones se dispersan nuevamente en 13,6 ml de acetona. Se añaden 2 gotas de trietilamina a la dispersión (las partículas se dispersan inmediatamente).

Caracterización

40

[0125]

DLS

MUESTRA	PDI	Z-prom.	Dv1	% V1
Fe ₃ O ₄ -DDA	0,218	34,5 (±0,2)	22,4 (±0,5)	100

45 Ejemplo 6

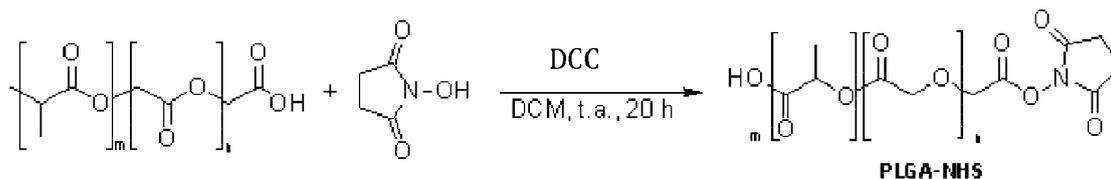
Síntesis de polímero PLGA-*b*-PEG-COOH 43-3 kDa

50 **[0126]** Para la síntesis del copolímero de bloque PLGA-*b*-PEG-COOH, el precursor PLGA-COOH (PM 44-10 kDa) se activó con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) usando la química de acoplamiento de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y después combinando el aducto con la parte amino funcional PEG-NH₂ (PM 2-3 kDa) en diclorometano (DCM) como se describe a continuación:

Etapa 1: Activación de la funcionalidad carboxílica con NHS

55

[0127]



Reactivos

98 g	PLGA-COOH (50:50 Poli (DL-Lactida-co-glicólido), Grupo final de carboxilato
1,037 g	NHS (N-hidroxisuccinimida 98 %)
720 ml	DCM (diclorometano > 99,9 %)
1,98 g	DCC (N, N Diciclohexilcarbodiimida 99 %)
990 ml	DCM (diclorometano > 99,9 %)
1600 ml	Éter dietílico (≥99,8)

Proceso

5

[0128] Se añadieron PLGA-COOH y 600 ml de diclorometano a un matraz de cuatro bocas de 5 l en nitrógeno. Después de la solubilización del polímero, se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS) y después N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC- aproximadamente 0,25 g a la vez); el sistema se dejó en agitación durante aproximadamente 40 h en una atmósfera inerte. Se usaron 120 ml de diclorometano para lavar el embudo de los sólidos para no perder las materias primas.

10

[0129] La suspensión amarilla se filtró en un matraz de cola de 2 l para eliminar la diciclohexilurea. El matraz de 5 l se lavó con 250 ml (X3) y 190 ml de CH₂Cl₂. El producto se concentró hasta aproximadamente 400 ml de volumen mediante un evaporador rotatorio en un matraz de 1 l (50 ml de lavado con DCM seco); se obtuvo una densa suspensión amarillenta.

15

[0130] El PLGA-NHS se precipitó usando 400 ml (X4) de éter dietílico frío. Para cada lavado, se decantó el sólido blanco y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, el sólido se seca durante aproximadamente 2 h 30' con la bomba de aceite.

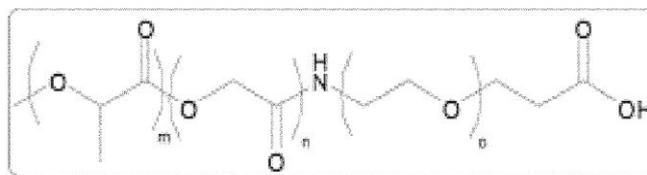
20

Etapa 2: Conjugación de PLGA-NHS con NH₂-PEG-COOH

PLGA-NHS

25

[0131]



CHCl₃

30

CH₂Cl₂ - PM = 119,38

DIPEA N-Etildiisopropilamina [(CH₃)₂CH]₂NC₂H₅ - PM=129.24 COOH-PEG-NH₂ HCl x NH₂-PEG-O-C₃H₆-COOH- PM PEG= 3000da

Reactivos

PLGA-NHS (intermedio de reacción)	
1 l (síntesis)	CHCl ₃ (cloroformo ≥99,5)
100 ml + 250 ml (lavados)	CHCl ₃ (Cloroformo ≥99 % estab., con 0,75 % de etanol)
1,2 ml	DIPEA (N,N-diisopropiletilamina 99,5 %)
7 g	COOH-PEG-NH ₂ (relación de forma de polímero-hidrocloruro)
1250 ml	Éter dietílico (≥99,8 %)
1250 ml	Agua Desionizada

Proceso

- 5 **[0132]** En un matraz de 3 bocas de 2 l equipado con un agitador mecánico, en un flujo de nitrógeno, el intermedio resultante se disolvió en 1 l de cloroformo. Se añadieron 1,2 ml de DIPEA al sistema usando una jeringa y posteriormente 7 g de COOH-PEG-NH₂ (pequeñas adiciones). El sistema se dejó en agitación bajo flujo inerte durante 90 h.
- 10 **[0133]** Desde el matraz de 3 bocas, la solución amarilla se transfiere a un matraz de 2 l con 1 boca y se lava con 100 ml de cloroformo.
- [0134]** El producto se concentró hasta aproximadamente 550 ml (volumen de destilado CHCl₃ = 650 ml) por medio de un evaporador rotatorio. El producto se transfiere desde el matraz de 2 l al matraz de 1 l con 1 boca (lavado con 250 ml de CHCl₃).
- 15 **[0135]** El copolímero se precipitó y se lavó con 250 ml (X5) de éter dietílico frío: al principio, la suspensión debe añadirse lentamente y agitarse con una varilla de vidrio para evitar la saturación excesiva. En cada lavado, el sistema se dejó en reposo en un baño de hielo y, a continuación, se retiró el sobrenadante (suspensión opalescente que contenía sales cuaternarias e impurezas orgánicas sin reaccionar).
- 20 **[0136]** El sólido blanco de aspecto gomoso se lavó con 250 ml (X5) de agua desionizada para eliminar los restos de COOH-PEG-NH₂ sin reaccionar.
- 25 **[0137]** El sistema se puso bajo vacío (bomba de anillo líquido primero y bomba de aceite después), secado al vacío alternativo (bomba de aceite-trampa a -30 °C), disgregación del polímero para facilitar el secado y el almacenamiento en un congelador durante la noche. El procedimiento se repite hasta que no se observe más pérdida de peso.
- [0138]** El producto se almacena en un congelador.
- 30 **[0139]** Se recuperaron 86,80 g de polímero (rendimiento de aproximadamente 83 %).

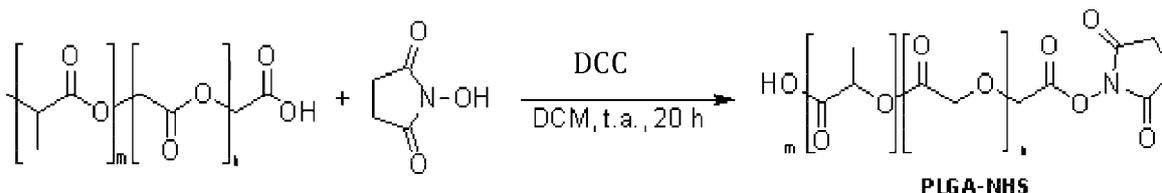
Ejemplo 7

Síntesis (PLGA-b-PEG-COOH 12-3 kDa)

35

Etapa 1: Activación de la funcionalidad carboxílica con NHS

[0140]



40

Especificaciones técnicas del reactivo:

[0141]

45

Reactivos

- 7 g PLGA-COOH 7000-17000 (50:50 Poli (DL-Lactida-co-glicólido), Grupo final de carboxilato) → 0,582 mmol
- 150 ml CH₂Cl₂ (Diclorometano- >99,9 %) para la solubilización de PLGA-COOH
- 0,27 g NHS (N-hidroxisuccinimida- 98 %) lavado con 30 ml de CH₂Cl₂ → 2,34 mmol
- 0,51 g DCC (N,N-Diciclohexilcarbodiimida- 99 %) lavado con 50 ml de CH₂Cl₂ → 2,493 mmol
- 70 ml CH₂Cl₂ (diclorometano> 99,9 % para lavar el matraz de 500 ml antes de la filtración en Buckner
- 550 ml Éter dietílico (Aldrich ≥ 99,8 %)

Se añadieron PLGA-COOH y 150 ml de diclorometano a un matraz de 500 ml en nitrógeno. Después de la solubilización del polímero, se añadió el NHS (30 ml de CH₂Cl₂ para el lavado del embudo) y, a continuación, se añadió DCC - adiciones consecutivas - 50 ml de CH₂Cl₂ para el lavado del embudo).

50

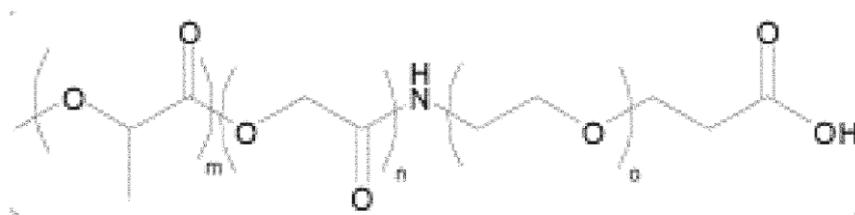
[0142] El sistema se dejó en agitación durante aproximadamente 24 horas en una atmósfera inerte.

[0143] La solución incolora (con un sólido blanco en suspensión) se filtró en Buckner en un matraz de cola de 1 l para eliminar la diciclohexilurea. El matraz de 500 ml se lavó con 70 ml de CH₂Cl₂.

[0144] El producto se transfirió a un matraz de 1 boca con forma de pera y se concentró mediante un evaporador rotatorio Buchi, después de aproximadamente 1 h, se obtuvo una suspensión blanca espesa.

Etapa 2: Conjugación de PLGA-NHS con NH₂-PEG-COOH

[0145]



Reactivos

- PLGA-NHS (reacción intermedia) en suspensión espesa
- 260 ml CHCl₃ (Cloroformo-Aldrich ≥99,5 % -Cat) para intermedio
- 20 ml CHCl₃ para lavado con amino PEG COOH
- 0,35 ml DIPEA (N,N-diisopropiletilamina 99,5 %)
- 1,82 g COOH-PEG-NH₂ (relación de forma de polímero-hidrocloruro) → 0,6066 mmol
- 520 ml Éter dietílico (≥99,8 %)
- 300 ml Agua Desionizada

Proceso

[0146] En un matraz de 500 ml en nitrógeno, se solubilizaron el intermedio 100 (X2) y 60 ml de CHCl₃. Se añadieron 0,35 ml de DIPEA al sistema usando una jeringa y posteriormente 1,82 g de COOH-PEG-NH₂ con lavado en embudo con 20 ml de CHCl₃. El sistema se dejó en agitación bajo flujo inerte durante 96 h.

[0147] Desde el matraz de 4 bocas, la suspensión, filtrada en Buckner para detectar la presencia de residuos marrones y blancos, se transfirió a un matraz de 1 boca de 500 ml que se lavó con unos pocos ml de cloroformo.

[0148] El producto se concentra (volumen CHCl₃ destilado = 170 ml) por medio de un evaporador rotatorio. A la solución amarilla se añaden 120 ml de éter dietílico frío (suspensión blanca-frotando con varilla de vidrio-baño de hielo), 60 ml (suspensión blanca en baño de hielo), 80 ml (comienzo del baño de hielo de precipitación), 60 ml (congelador durante aproximadamente 1 hora). El producto se lavó con 100 ml (X2) de éter dietílico frío. En cada lavado, el sistema se dejó en reposo en el congelador y, a continuación, se retiró el sobrenadante (suspensión opalescente que contenía sales cuaternarias e impurezas orgánicas sin reaccionar). Las tres fracciones en éter se secaron (1,20 g).

[0149] El sólido blanco de aspecto gomoso se lavó con 100 ml (X3) de agua desionizada (baño de hielo) para eliminar los restos de COOH-PEG-NH₂ sin reaccionar.

[0150] El copolímero (18,10 g) se colocó al vacío en un evaporador rotatorio de Buchi y, a continuación, se conectó a la bomba de aceite (trampa de hielo seco con etanol) durante aproximadamente 4 h (7,78 g - secado alternando con disgregación). El producto se sometió a disgregación y, a continuación, se colocó al vacío, alternando etapas de secado, disgregación y congelador. El procedimiento se repite hasta que no se observe más pérdida de peso.

[0151] El producto se almacena en un congelador.

[0152] Se recuperaron 7,52 g de polímero (rendimiento del 88 % -86 %).

(2 g) P.M.:11.300 g/mol - 0,1769 mmol

(5 g) P.M.:15400 g/mol - 0,3246 mmol

mmol de PLGA COOH: 0,5015

g de PLGA PEG COOH (mol_{2g} * P.M._{2g}) + (mol_{5g} * P.M._{5g}) = 2,529 + 5,972 = 8,5 g

Cálculos con PM = 12.000. Esperado 8,74 g de PLGA PEG COOH

Ejemplo 8

5 Configuración del nanobiorreactor (NBR)

Reactivos:

10 **[0153]** 40,0 g de Fe₃O₄-DDA igual a 9,5e-04 mol de Fe₃O₄; 220,0 mg de PLGA-b-PEG-COOH igual a 5e-06 mol de polímero; 400 ml de tampón fosfato 1 mM

Después de haber solubilizado 220,0 mg de polímero en 5 ml de THF, se inyectan 40,0 g de Fe₃O₄-DDA en la solución orgánica. Usando una jeringa de 60 ml, el producto se concentra en un evaporador rotatorio para eliminar el THF presente. El proceso se detiene cuando ya no hay formación y condensación de vapores orgánicos.

15 **[0154]** A continuación, el producto se concentra y se dializa con el sistema Cogent M con una membrana Pellicon 2mini 100 kDa, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Una vez que el sistema se ha drenado, se introduce la suspensión de NBR, concentrada por un factor teórico de 1,5 y, a continuación, dializada con 2.000 ml de agua tamponada UP 10⁻³M.

20 **[0155]** Se concentra adicionalmente a un volumen de 100 ml en el sistema Pellicon XL con una membrana de 500 kDa después de mantener el sistema en NaOCl 1:10 durante 30 minutos.

[0156] El proceso se detiene una vez que se ha alcanzado el factor de concentración teórico de 20X (conc. teórica, de inorgánico: 1,0 %).

25

[0157] A continuación se filtra con filtros Millipore Sterivex de 0,22 µm en PES. Se almacena en refrigerador.

Caracterización

30 **[0158]**

DLS

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	% (pico de volumen)	notas
NBR	0,125	43,10 (±0,61)	34,55 (±1,30)	100	Después de la filtración

Potencial Z

Muestra	Zpot	% (pico Z)	Notas
NBR	-43,2	100	Después de la filtración

35

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR	0,735	1,015	43,84

Estabilidad en medio de cultivo:

40 **[0159]** la muestra se diluye a 1:20 (0,05 % en peso de fase inorgánica) en DMEM + 10 % de FBS + glutamina + antibiótico: Está transparente, sin agregados.

DLS

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	% (pico de volumen)
Medio de cultivo NBR (20X)	0,161	139,60 (±1,06)	143,20 (±3,06)	100

45 Ejemplo 9

Producción continua en nanobiorreactor (NBR)

Reactivos:

50

[0160] 200 mg de PLGA-b-PEG-COOH igual a 4.4e-06 mol de polímero; 52,6 g de THF; 36,4 g de Fe₃O₄-DDA igual a 8,6e-04 mol de Fe₃O₄; 1000 ml de H₂O MilliQ con tampón fosfato a pH 7,4 = 10⁻³M.

55 **[0161]** A un matraz Erlenmeyer de 100 ml, se añaden 0,2 g de polímero PLGA-b-PEG-COOH y 52,6 g de THF, agitando hasta la disolución completa (varios minutos). Por último, se añaden 36,4 g de Fe₃O₄-DDA.

Síntesis:

5 **[0162]** Se instaló un sistema de bomba peristáltica doble después de la calibración para realizar la adición de la solución orgánica en corriente acuosa (relación de volumen de THF/agua = 1/10). Los tubos respectivos extraen la solución directamente de los pulmones que contienen la solución de THF (con PLGA-*b*-PEG-COOH y partículas) y la solución tampón de fosfato preparada en una botella de 2,5 l.

10 **[0163]** Primero se extrae el producto en un evaporador rotatorio para eliminar el THF y, a continuación, se seca; una vez que el componente volátil se ha evaporado, se recupera el producto. A continuación, el producto se concentra y se dializa con el sistema Cogent M con membrana Pellicon 2mini 100 kDa.

[0164] Vacando el sistema, se recuperan 254,5 g de producto.

15 **[0165]** Factor de concentración teórico: 4,7X
Concentración teórica: 0,078 %
Tiempo necesario para concentración y diálisis: 20'.

20 **[0166]** El producto se concentra aún más en Pellicon XL con membrana de 500 kDa. Tiempo necesario para la concentración final: 1 h.

[0167] Recuperado: 11,51 g netos del volumen muerto dentro de la membrana, aproximadamente 1-2 ml.

25 **[0168]** Conc. teor. (considerando el V_{muerto} 1,5 ml): 14 %

Caracterización

[0169]

30

DLS

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	% (pico de volumen)	de notas
NBR	0.125	41,8 (+0,4)	34,2 (+0,9)	100	Después de la concentración en Pellicon XL; diluido al 0,05 % en tampón

** para las pruebas de estabilidad en suero al 0,05 % (teórico)

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR	1,078	1,490	64,35

Ejemplo 10

35 Configuración de nanobiorreactor dirigido con moAb (NBR_hERG)

Reactivos:

40 **[0170]** 40,38 ml de NBR igual a 0,533 μmol de -COOH; 2,32 ml de solución de Sulfo-NHS 0,23 mM igual a 0,533 μmol ; 190 μl de solución EDAC * HCl 28 mM igual a 0,053 mmol; 2,64 ml de solución de 1,52 mg/ml de hERG igual a 4,0 mg de hERG (2,7e-08 mol); 1.500 ml de solución acuosa de Na₂HPO₄ = 10⁻³M

45 **[0171]** A un recipiente estéril de 250 ml, se añaden 40,38 ml de NBR y, a continuación, se añaden 0,19 ml de EDAC (0,028 M) y 2,32 ml de Sulfo-NHS. Después de 40' (en reposo), se diluyen 2,64 ml de la solución hERG1 (1,52 mg/ml = 4,0 mg) con 15,52 ml de tampón fosfato 1 mM y se añade a 42,89 ml de NBR activado. (V_{final} = 61,05 ml; Fe₃O₄ = 0,056 %). Se deja en reposo durante la noche.

50 **[0172]** El sistema está configurado para la diálisis del producto utilizando la membrana Pellicon XL 500 kDa en PES. El sistema se lava con 300 ml de H₂O MilliQ, se vierten 400 ml de hipoclorito de sodio al 0,5 % y se deja esterilizar el sistema durante aproximadamente 30 minutos. A continuación se lava con 400 ml de tampón 1 mM.

55 **[0173]** Luego, el producto se concentra a un volumen de 22 ml, ajustando la velocidad de la bomba a aproximadamente 15 ml/min (P = 0,27 bar). También se analiza el primer permeado de diálisis mediante la prueba BCA®.

[0174] Se dializa con 100 ml (4 volúmenes) de tampón 1 mM a una velocidad de 15 ml/min (P = 0,27 bar) y se

concentra a un volumen de 4,7 ml.

[0175] Por último, el producto se filtra con filtros de 0,22 µm en PES. Se almacena en refrigerador. El producto así obtenido exhibe una buena estabilidad después de la dilución en medio de cultivo a 0,05 % en peso; no hay agregados o formas sólidas en floculación visibles a simple vista.

Caracterización

[0176]

ICP

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	% (pico de volumen)	notas
NBR_hERG	0,157	66,14 (±0,30)	50,79 (±0,32)	100	Producto final

Potencial Z

Muestra	Zpot	% (pico Z)	Notas
NBR_hERG	-40,0	100	Producto final

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR_hERG	0,226	0,312	13,465

Estabilidad:

[0177]

DLS

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	% (pico de volumen)	notas
NBR_hERG	0,179	136,7 (±0,7)	137,6 (±8,4)	100	Producto final

Prueba BCA

[0178] Para la ejecución de la prueba BCA, la concentración de NBR_hERG se normaliza con respecto a la correspondiente libre de anticuerpos (NBR), que, por lo tanto, sirve como un blanco. Una vez que la tinción se ha desarrollado mediante la adición del reactivo relevante, las muestras se analizan con un espectrofotómetro UV-vis, entonces, los valores de absorbancia se interpolan en la curva de calibración preparada previamente (usando un patrón de BSA) y se extrapolan las concentraciones equivalentes de moAb. La cantidad neta de anticuerpo presente en el NBR_hERG se calcula restando los valores de moAb encontrados en la fracción eluída y en el blanco (NBR) del correspondiente a la muestra de NBR_hERG. Véase la ecuación a continuación:

$$C_{\text{moAb}} (\text{NBR}_{\text{moAb}})_{\text{neto}} = C_{\text{moAb}} (\text{NBR}_{\text{moAb}}) - C_{\text{moAb}} (\text{NBR}) - C_{\text{moAb}} (\text{fracción eluída})$$

[0179] Los siguientes son los valores experimentales medidos:

Fracción eluída de mAb = 45 µg/ml

mAb NBR = 435 µg/ml

mAb NBR_hERG = 863 µg/ml

mAb real (mAb NBR_hERG - mAb NBR) = 428 µg/ml

Relación mAb/Fe₃O₄ = 0,14

Ejemplo 11

Configuración de nanobiorreactor dirigido con Fluo-Dyes (NBR_Fluo)

[0180]

Especificaciones técnicas del reactivo:

NBR [Fe₃O₄] = 0,081 % [PLGA-*b*-PEG-COOH] = 0,061 % *
 1,4-diaminobutano PM = 88,15 g/mol d = 0,877 g/ml

ES 2 745 528 T3

Alexa Fluor® 750 (750 nm) PM = 1300 g/mol
Tampón fosfato en H₂O UP C = 1M; pH 7,4

Reactivos:

30,00 ml de NBR	(0,40 µmol de PPGC43-3.1)
1 mg de Alexa Fluor 750	(en 770 µl → [1 mM])
1.500 ml de H ₂ O MilliQ con tampón fosfato a 7,4	= 10 ⁻³ M
Sulfo-NHS	PM = 217,13 g/mol
EDAC-HCl	PM = 191,7 g/mol

Preparación de la solución de Fluo-NH₂

5 **[0181]** El fluoróforo se solubiliza con 770 µl de DMSO obteniendo una solución de 1 nmol/µl.

[0182] En un vial de 12 ml, se añaden 4950 µl de tampón fosfato 1 mM y se añaden 50 µl de la solución fluoróforo Alexa Fluor 750 (50 nmol). Luego, se coloca en agitación magnética y, a continuación, se añaden 100 µl de solución 132 µg/ml de 1,4-diaminobutano (correspondiente a 150 nmol = 13,2 g). La solución se deja reaccionar durante 24 h, en la oscuridad y bajo flujo de nitrógeno. El fluoróforo terminal NH₂ así obtenido se utilizará para la etapa de síntesis posterior sin purificarse.

Preparación de la solución de Sulfo-NHS (0,23 mM)

15 **[0183]** Pesar exactamente 5,0 mg de Sulfo-NHS y solubilizar en un matraz de 100 ml con tampón fosfato 1 mM.

Preparación de la solución EDAC (0,028 mM)

20 **[0184]** A un vial de 4 ml, se añaden 2,7 mg de EDAC y 0,5 ml de tampón 1 mM. Tapar y agitar para facilitar la mezcla. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de la reacción.

Síntesis:

25 **[0185]** A un recipiente de 100 ml, se añaden 30,00 ml de NBR DF y se añaden 0,14 ml de EDAC (0,028 M) y 1,72 ml de Sulfo-NHS (0,23 mM).

[0186] Volumen total: 30,00 ml + 0,14 ml + 1,72 ml = 31,86 ml
Después de 40' (en reposo), se añaden 2,64 ml de la solución Alexa Fluor 750 (10 nmol/ml).

30 **[0187]** Se deja reposar durante 4 h.

[0188] Se realiza un control DLS (NBR_Fluo TQ).

Purificación:

35 **[0189]** El sistema está configurado para la diálisis del producto utilizando una membrana Pellicon XL de 500 kDa en PES y una bomba peristáltica Masterflex L/S con cabezal II de carga fácil. A continuación se esteriliza el sistema con un flujo de hipoclorito de sodio al 0,5 % y se deja reaccionar durante aproximadamente 30 minutos. Después de lavar con agua estéril MilliQ y configurar el sistema con tampón fosfato 1 mM (también estéril), el producto se concentra a un volumen de 10 ml (recolectar 23 ml de permeado) ajustando la velocidad de la bomba a aproximadamente 12 ml/min (P = 0,25 mbar). Se retiene una velocidad del primer permeado para el análisis UV-VIS. A continuación, se dializa con 40 ml (4 volúmenes) de tampón 1 mM trabajando a una velocidad de 12 ml/min (P = 0,25 mbar). En este punto, se concentra hasta un volumen de 6 ml.

45 Recuperado: 5,00 g

[0190] Factor de concentración de síntesis teórico: 5.8X
Factor de concentración teórico en comparación con NBR: 5X

Filtración:

50 **[0191]** El producto se filtra con filtros Millex de 0,22 µm en PES. Para la purificación de todo el producto, se necesita un filtro. Se almacena en refrigerador.
NBR_27_Fluo_01 DF recuperado = 4,49 g

55 Caracterización

[0192]

DLS

R0366/2013; R0368/2013					
Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	%	notas
NBR_Fluo	0,147	55,14 ($\pm 0,59$)	42,03 ($\pm 1,59$)	100	DF. dil. 1:10 en tampón 1 mM

5

Potencial Z

R0368/2013						
Muestra	Zpot	Zanchura	Cond	% Z	QF	Notas
NBR_Fluo	-42,0	18,3	0,233	100	2,28	DF, dil. 1:10 en tampón 1 mM

ICP

R0368/2013			
Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR_Fluo	0,243	0,336	14,532

10

UV-Vis

R0368/2013				
Muestra	Abs.	ϵ	Conc. (nmol/l)	% unido
Fración eluída NBR_Fluo	0,125575	242000	558	27,1

Ejemplo 12

Configuración de nanobiorreactor dirigido con Fluo-Dyes (NBR_Fluo)

15

[0193]

Especificaciones técnicas del reactivo:

NBR	[Fe ₃ O ₄] = 0,081 % [PPGC43-3.1] = 0,061 % *
1,4-diaminobutano	PM = 88,15 g/mol d = 0,877 g/ml
Alexa Fluor 750 (750 nm)	PM = 1300 g/mol
Tampón fosfato en H ₂ O UP	C = 1M; pH 7,4

Reactivos:

30,00 ml de NBR	(0,40 μ mol de PPGC43-3.1)
50,00 nmol Cianina 5-1,4-diaminobutano	(en 5,0 ml \rightarrow [10 μ M])
1.500 ml de H ₂ O MilliQ con tampón fosfato a 7,4	= 10 ⁻³ M
Sulfo-NHS	PM = 217,13 g/mol
EDAC-HCI	PM = 191,7 g/mol

20 Preparación de la solución de Fluo-NH₂

[0194] A un vial de 12 ml, 5 ml de tampón fosfato 1 mM, 50 nmol (1 botella) Cianina 5, se añaden éster de NHS y, a continuación, 150 nmol (13,2 g) de 1,4-diaminobutano. La solución se deja reaccionar durante 24 h, en oscuridad, en agitación magnética y flujo de nitrógeno. El fluoróforo terminal NH₂ así obtenido se utilizará para la etapa de síntesis posterior sin purificarse, en flujo de nitrógeno. El fluoróforo terminal NH₂ así obtenido se utilizará para la etapa de síntesis posterior sin purificarse.

25

Preparación de la solución de Sulfo-NHS (0,23 mM)

30 **[0195]** Pesar exactamente 5,0 mg de Sulfo-NHS y solubilizar en un matraz de 100 ml con tampón fosfato 1 mM.

Preparación de la solución EDAC (0,028 mM)

[0196] A un vial de 4 ml, se añaden 2,7 mg de EDAC y 0,5 ml de tampón 1 mM. Tapar y agitar para facilitar la mezcla. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de la reacción. Síntesis:

35

A un recipiente estéril de 50 ml, se añaden 30,00 ml de NBR y 0,14 ml de EDAC (0,028 M) y 1,72 ml de Sulfo-NHS

(0,23 mM).

[0197] Volumen total: 30,00 ml + 0,14 ml + 1,72 ml = 31,86 ml
Después de 40' (en reposo), se añaden 2,64 ml de la solución de Cianina-5-NH₂ (10 nmol/ml).

5

[0198] Se deja reposar durante 4 h.

Purificación:

10 **[0199]** El sistema está configurado para la diálisis del producto utilizando la membrana Pellicon XL 500 kDa en PES.

15 **[0200]** En este punto, el producto se concentra a un volumen de 10 ml (recoger 23 ml de permeado). Ajustar la velocidad de la bomba a aproximadamente 12 ml/min (P = 0,25 mbar); t = 4' Conservar una velocidad del primer permeado para el análisis UV-VIS.

[0201] Dializar con 40 ml (4 volúmenes) de tampón 1 mM. v 12 ml/min (P = 0,25 mbar); t = 11'
En este punto, se concentra a un volumen de 6 ml; t = 5'.

20 Recuperado: 4,29 g

[0202] Factor de concentración de síntesis teórico: 5,5X
Factor de concentración teórico en comparación con NBR: 4.8X

25 Filtración:

[0203] El producto se filtra con filtros Millex de 0,22 µm en PES. Para la purificación de todo el producto, se necesita un filtro. Se almacena en refrigerador.
NBR_Fluo recuperado = 4,11 g

30

Ejemplo 13

Producción de nanobiorreactor dirigido con moAb y Fluo-Dyes (NBR_hERG-Fluo)

35 **[0204]**

Especificaciones técnicas del reactivo:

NBR	[Fe ₃ O ₄] = 0,821 % [PPGC43-3.1] = 0,616 %
1,4-diaminobutano	PM = 88,15 g/mol d = 0,877 g/ml
Éster de cianina 5-NHS	(650 nm)
Tampón fosfato en H ₂ O UP	C = 1 M; pH 7,4
Sulfo-NHS	PM = 217,13 g/mol
EDAC-HCl	PM = 191,7 g/mol
hERG1	PM = 15000 g/mol

Reactivos:

4,79 ml de NBR	(0,64 µmol de PPGC43-3.1)
25 nmol de éster de cianina 5-NHS	(en 2,5 ml → [10 µM])
2,7 mg de EDAC	
5,0 mg de Sulfo-NHS	
4,8 mg de hERG	(3,2 ml → 1500 µg/ml)
1.500 ml de H ₂ O MilliQ con tampón fosfato a pH 7,4	[] = 10 ⁻³ M

Preparación de la solución de Fluo-NH₂

40

[0205] A un vial de 12 ml, se añaden 5 ml de tampón fosfato 1 mM, 50 nmol (1 botella) de éster de cianina 5 NHS, colocar en agitación magnética y, a continuación, añadir 100 µl de solución de 13,2 mg/100 ml de 1,4-diaminobutano (correspondiente a 150 nmol = 13,2 µg). La solución se deja reaccionar durante 24 h, en la oscuridad y bajo flujo de nitrógeno. El fluoróforo terminal NH₂ así obtenido se utilizará para la etapa de síntesis posterior sin purificarse.

45

Preparación de la solución de Sulfo-NHS (0,23 mM)

ES 2 745 528 T3

[0206] Pesar exactamente 5,0 mg de Sulfo-NHS y solubilizar en un matraz de 100 ml con tampón fosfato 1 mM.

Preparación de la solución EDAC (0,028 mM)

5 **[0207]** A un vial de 4 ml, se añaden 2,7 mg de EDAC y 0,5 ml de tampón 1 mM. Tapar y agitar para facilitar la mezcla. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de la reacción.

Síntesis:

10 **[0208]** A un recipiente estéril de 100 ml, se añaden 7,95 ml de tampón 1 mM y, a continuación, 4,79 ml de NBR. La mezcla se agita suavemente para mezclar y, a continuación, se añaden 2,29 ml de EDAC (0,028 M) y 2,79 ml de Sulfo-NHS (0,23 mM).

[0209] Volumen total: 7,95 ml + 4,79 ml + 2,29 ml + 2,79 ml = 17,83 ml

15 Después de 40' (en reposo), se añaden 2,5 ml de la solución de éster de cianina 5-NFH5 (10 nmol/ml). A continuación, se diluyen 3,2 ml de la solución de hERG1 (1,5 mg/ml = 4,8 mg) en 52,32 ml de tampón fosfato 1 mM y se añade a la suspensión que contiene NBR activado y fluoróforo. Se deja en reposo durante la noche.

Purificación:

20 **[0210]** El sistema está configurado para la diálisis del producto utilizando la membrana Pellicon XL 500 kDa en PES ya usada para NBR_19. Lavar con 300 ml de H₂O MilliQ, a continuación, hacer fluir con 400 ml de hipoclorito de sodio al 0,5 % y dejar en hipoclorito durante aproximadamente 30 minutos. Lavar el sistema con 400 ml de tampón 1 mM.

25 **[0211]** En este punto, el producto se concentra a un volumen de 20 ml (recoger 50 ml de permeado). Ajustar la velocidad de la bomba a aproximadamente 14 ml/min (P = 0,2 mbar); t = 15' Conservar una velocidad del primer permeado para la prueba de BCA.

30 **[0212]** Dializar con 80 ml (4 volúmenes) de tampón 1 mM. v 14 ml/min (P = 0,2 mbar); t = 16'
En este punto, se concentra a un volumen de 10 ml; t = 4'.

Recuperado: 6,46 g

35 **[0213]** Factor de dilución teórico en comparación con NBR: 1,3X

Filtración:

40 **[0214]** El producto se filtra con filtros Millex de 0,22 µm en PES. Para la purificación de todo el producto, se necesita un filtro. Se almacena en refrigerador.
NBR_hERG-Fluo recuperado = 7,79 g

Caracterización

45 **[0215]**

DLS

Muestra	Fechas	PDI	Z-prom.	V-media	%	notas
NBR_hERG1-Fluo	15-feb	0,118	47,39 (±0,28)	38,25 (±0,89)	100	DF, dil 1:10 en tamp. 1 mM
NBR_hERG1-Fluo DMEM	15-feb	0,176	155,4 (±11,8)	171,5 (±19,4)	100	DF, dil 1:10 en DMEM Todo en

Potencial Z

Muestra	Fechas	Zpot	Zanchura	Cond	% Z	QF	Notas
NBR_19_hERG 1_Fluo_01 DF	15-feb	-42,4	7,4	0,256	100	2,26	DF, dil. 1:10 en tampón 1 mM

50

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR_hERG1-Fluo	0,320	0,442	19,081

Ejemplo 14

Producción de nanobiorreactor cargado con principio activo (NBR_PTX y NBR_hERG_PTX)

5

[0216]

Especificaciones técnicas del reactivo:

PPGC43-3.1 (lote 5-A)	50:50 Pm = 43.000; PEG Pm 3.000
Fe ₃ O ₄ -DDA	[Fe ₃ O ₄] = 0,55 %
PTX	Descubrimiento de productos químicos finos
Tampón fosfato 1 mM	pH= 7,4
THF	d = 0,89

Reactivos:

35,6 g de Fe ₃ O ₄ -DDA (40,0 ml)	(195,8 mg de Fe ₃ O ₄)	490 mg/l (en agua)
212,6 mg de PPGC43-3.1		490 mg/l (en agua)

10 21,2 mg de PTX
400 ml de tampón fosf. 1 mM (real: 440 ml)
Jeringa de 60 ml aguja de 25G

Preparación de la solución de THF [con PLGA-PEG (5,5 mg/g), PTX (0,55 mg/g) y Fe₃O₄ (5,5 mg/g)]

15

[0217] Se solubilizan 212,6 mg de PPGC43-3.1 en 4 ml (vial de 4 ml) de THF y 21,2 mg de PTX en 2,12 ml de THF (vial de 4 ml) y se añade a 35,6 g de Fe₃O₄-DDA en un matraz de 100 ml

Síntesis:

20

[0218] La solución de THF se apila en 400 ml de tampón fosfato 1 mM usando una jeringa de 60 ml con aguja de 25G. NBR_PTX *obtenido*: 455,8 g

Extracción

25

[0219] El producto se trata en un evaporador rotatorio para eliminar el THF presente. Con este fin, se traslada a un matraz de 1.000 ml y se establecen las siguientes condiciones:

30

T del baño 40 °C
Presión: 154 mbares
Revoluciones: 80 rpm
Después de 1 h, una vez que la evaporación del componente volátil ha terminado, el producto se recupera y se pesa.

35 **[0220]** NBR_PTX recuperado en evaporador rotatorio = 418,22 g (37,58 g de THF eliminado)

Diálisis y concentración:

40

[0221] El producto se concentra y se dializa con el sistema AMICON con una membrana de 50 kDa, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 1) lavar con 50 ml de H₂O osmotizada para eliminar las impurezas en la membrana
- 2) sistema de lavado con solución con 50 ml de tampón fosfato en H₂O UP, 10⁻³M. Una vez que el sistema se ha drenado, se añade NBR_PTX y se concentra a aproximadamente 100 ml

45

[0222] Después, se realizan 4 lavados con 150 ml de tampón 1 mM. Por último, se concentra a 75 ml desechando 45 ml de la fracción eluída.

50

[0223] Vaciando el sistema, se recuperan 59,40 g de producto (NBR_PTX).

[0224] Factor de concentración teórico = 7,7X

Filtración:

[0225] El producto se filtra con un filtro Millipore Sterivex 0,22 µM en PES (filtros cilíndricos).

Caracterización

5 **[0226]**

DLS

Muestra	PDI	Z-prom.	V-media	%	notas
NBR_PTX	0,174	53,55 (±0,58)	41,66 (±0,55)	100	CD, dil. 1:10 en tampón 1 mM

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR_PTX	0,347	0,480	20,716

10 Estabilidad:

[0227] La muestra concentrada se diluyó a 1: 8 en DMEM + FBS al 10 % + glutamina + antibiótico: es límpida sin agregados

15

DLS

R0211/2013						
Muestra	Fechas	PDI	Z-prom.	V-media1	%	notas
NBR_PTX DMEM Al	08-mayo	0,155	126,1 (±2,2)	121,8 (±4,6)	100	CD, dil. 1:8 en DMEM Todos en

Análisis PTX

Muestra	relación PTX:PLGA-PEG	% FWR	% LC	% LE	mg/ml de PTX
NBR_PTX_10	1:10	5,5	2,1	40,0	142,57

Ejemplo 15

20

Producción de nanobiorreactor cargado con principio activo (NBR_PT-X y NBR_hERG_PTX)

[0228]

Especificaciones técnicas del reactivo:

NBR_PTX	[Fe ₃ O ₄] = 0,48 % [PPGC43-3.1] = 0,36 % *
Tampón fosfato en H ₂ O UP	C = 1M; pH 7,4
Sulfo-NHS	PM = 217,13 g/mol
EDAC	PM = 155,24 g/mol d = 0,877 g/ml
hERG	PM = 150000 g/mol

25

Reactivos:

4,26 ml de NBR_PTX_p10 DF	(3,33*10 ⁻⁴ µmol de PPGC43-3.1)
5,0 mg de Sulfo-NHS	(en 100 ml → [0,23 mM])
20 µl de EDAC	(en 4 ml → [28 mM])
2,5 mg de hERG	(0,833 ml * 3 mg/ml)
1.500 ml de tampón fosfato a pH 7,4	[] = 10 ⁻³ M

Preparación de la solución de Sulfo-NHS (0,23 mM)

30

[0229] Pesar 5,0 mg de Sulfo-NHS y solubilizar en un matraz de 100 ml usando tampón fosfato 1 mM.

Preparación de la solución EDAC (0,028 mM)

[0230] A un vial de 4 ml, se añaden 2,7 mg de EDAC y 0,5 ml de tampón 1 mM. Tapar y agitar para facilitar la mezcla. Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de la reacción.

35

Síntesis:

ES 2 745 528 T3

[0231] A un recipiente estéril de 40 ml, se añaden 2,36 ml de tampón 1 mM y, a continuación, 4,26 ml de NBR_PTX. La mezcla se agita suavemente para mezclar y, a continuación, se añaden 1,19 ml de EDAC (0,028 M) y 1,45 ml de Sulfo-NHS.

5 **[0232]** Volumen total: 2,36 ml + 4,26 ml + 1,19 ml + 1,45 ml = 9,26 ml
Después de 40' (en reposo), se añade la solución HERG1 obtenida diluyendo 0,833 ml de la solución hERG1 (3 mg/ml) con 27,25 ml de tampón 1 mM. ($V_{\text{final}} = 37,34$ ml; $\text{Fe}_3\text{O}_4 = 0,056$ %).

10 **[0233]** Se deja en reposo durante la noche.

Purificación:

15 **[0234]** El sistema está configurado para la diálisis del producto utilizando la membrana Pellicon XL 500 kDa en PES. Lavar con 300 ml de H₂O MilliQ, a continuación, hacer fluir con 400 ml de hipoclorito de sodio al 0,5 % y dejar en hipoclorito durante aproximadamente 30 minutos. Lavar el sistema con 400 ml de tampón 1 mM.

20 **[0235]** En este punto, el producto se concentra a un volumen de 13 ml (recoger 25 ml de permeado). Ajustar la velocidad de la bomba a aproximadamente 13 ml/min ($P = 0,2$ mbar); $t = 5'$ Conservar una velocidad del primer permeado para la prueba de BCA.

25 **[0236]** Dializar con 60 ml (4 volúmenes) de tampón 1 mM. $v = 13$ ml/min ($P = 0,2$ mbar); $t = 14'$

En este punto, se concentra a un volumen de 10 ml; $t = 10'$.

Recuperado: 7,40 g

Factor de concentración de síntesis teórico: 5,5X

Factor de dilución teórico en comparación con NBR_PTX: 2.8X

Filtración:

30 **[0237]** El producto se filtra con filtros Sterivex de 0,22 μm en PES. Para la purificación de todo el producto, se necesita un filtro. Se almacena en refrigerador.

NBR_PTX recuperado = 6,88 g

Caracterización

35 **[0238]**

DLS

Muestra	Fechas	PDI	Z-prom.	V-media	%	notas
NBR_PTX	26-oct	0,138	63,62 ($\pm 0,58$)	50,58 ($\pm 0,60$)	100	DF, diluido a 1:10 en tamp. 1 mM

Potencial Z

Muestra	Fechas	Zpot	Zanchura	Cond	% Z	QF	Notas
NBR_PTX	26-oct	-37,3	13,8	0,231	100	2,17	DF, diluido a 1:10 en tamp. 1 mM

ICP

Muestra	% Fe	% Fe ₃ O ₄	m Molaridad
NBR_PTX	0,191	0,264	11,400
Rendimiento real del proceso = 94,5 %			

Ejemplo 16

45 Incorporación de NBR en linfocitos

50 **[0239]** Los linfocitos T y las células Jurkat son capaces de incorporar las nanopartículas con un método desarrollado por los solicitantes. Los linfocitos T/células Jurkat se cargan con construcciones a una concentración de 0,05 % en un medio de cultivo específico adecuado (medio). Para formar el medio que contiene las construcciones, las construcciones se dispensan primero y, a continuación, el medio de cultivo específico. El medio se prepara de la siguiente manera:

- MEDIO RPMI 1640, con 2,0 g/l de NaHCO₃ - sin L-Glutamina. (BIOCHROM) (código: F1215) - 500 ml añadidos con:
- 55 • L-GLUTAMINA, solución 200 mM (100X). (EUROCLONE) (código: ECB 3000D) - 5,5 ml sin dilución
- PIRUVATO DE SODIO, 100 mM (100X). (Gibco) (código: 11360-039) - 5,5 ml sin dilución

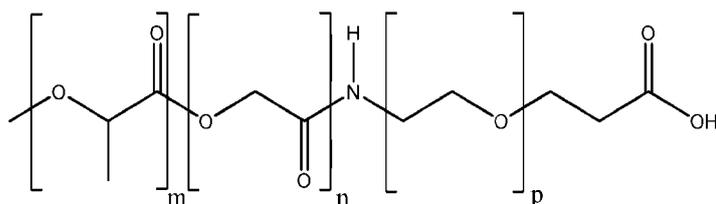
ES 2 745 528 T3

- Medio esencial mínimo MEM NEAA Aminoácidos no esenciales (100X). (Gibco) (código: 11140-035) - 5,5 ml sin dilución
- GENTOMIL (gentamicina) 80 mg/2 ml (AIC N.º 029314059) - 1 vial de 2 ml
- 2-MERCAPTOETANOL. (Merck) (código: 444203) - usar 5,5 ml de 2-mercaptoetanol de la siguiente manera:
5 37 µl de 2-MERCAPTOETANOL en 99,963 ml de H₂O estéril (vol final 100 ml)
- 10 % de suero bovino fetal FBS: Suero bovino fetal, Apto. (Sigma-Aldrich) (código: F6178)

10 Cuando sea necesario, se utilizará suero autólogo del paciente o medio en ausencia de suero en lugar de suero fetal bovino.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción que comprende una pluralidad de partículas nanométricas de magnetita cuya superficie está funcionalizada con catecol que tiene los grupos polares OH adheridos a la superficie de las partículas y la parte final, no unida a la superficie de la partícula, que presenta reactividad hidrofóbica, estando dichas partículas nanométricas de magnetita en forma de racimo, dicha construcción encapsulada en una matriz polimérica biocompatible.
2. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una molécula que tiene acción terapéutica dispersada en dicha matriz polimérica biocompatible.
3. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una pluralidad de nanorods de oro.
4. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha matriz polimérica biocompatible consiste en copolímeros biodegradables.
5. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dichos copolímeros biodegradables se seleccionan de: nanomicelas biodegradables, poliésteres, poliuretanos, policarbonatos, ácido poli-(glutámico), polieteramina y polibencilglutamato.
6. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas nanomicelas biodegradables consisten en ácido poli (láctico-co-glicólico) y carboxilato de polietilenglicol (PLGA-b-PEG-COOH), que tiene la fórmula (I)



(I)

- en la que $m = [117-330]$; $n = [117-330]$; $p = [60-100]$,
7. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dichas moléculas con acción terapéutica se seleccionan de: agentes anticancerosos, secuestrantes de peroxinitrito, inhibidores de la superoxidismutasa, retinoides, citocinas, aspirina.
8. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el grupo carboxilo final del fragmento PEG-COOH de las micelas se funcionaliza adicionalmente con anticuerpos monoclonales, proteínas, péptidos o moléculas activas de interés para el reconocimiento específico por las sobreexpresiones celulares.
9. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dichos anticuerpos se seleccionan de: hEGR, hEGFR, IgG, moAb.
10. Un proceso para preparar una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que:
- una solución orgánica de polímero disuelto en un disolvente, mezclada con la suspensión de nanopartículas recubiertas con aglutinante orgánico, ambos en el mismo disolvente, y
 - una solución acuosa de Na_2HPO_4 1 mM
- se mezclan en un flujo constante en una célula de mezcla con síntesis *discontinua* o *continua*.
11. Un proceso para preparar una construcción de acuerdo con las reivindicaciones 7 y 8, en el que el grupo carboxilo final del fragmento PEG-COOH se activa para promover el ataque posterior por esterificación de los grupos terminales amino.
12. Una célula del sistema inmunitario humano que contiene una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
13. Una célula de acuerdo con la reivindicación 12, seleccionada entre: linfocitos T, monocitos, macrófagos, las células dendríticas, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos B, granulocitos neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, células gamma delta.

14. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en tratamientos de hipertermia.

5 15. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 y 13 para su uso en el diagnóstico de cáncer, enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, enfermedades cardiovasculares cerebrales, enfermedades infecciosas, trasplantes, enfermedades autoinmunes y también para el tratamiento de tumores, enfermedades cardiovasculares cerebrales, enfermedades degenerativas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer),
10 enfermedades infecciosas, trasplantes, cirrosis hepática y otras enfermedades **caracterizadas por** fibrogénesis, enfermedades **caracterizadas por** pérdida fetal recurrente, muerte fetal intrauterina, enfermedades neonatales, trastornos de la coagulación congénitos y adquiridos, trastornos genéticos, enfermedades autoinmunes y, finalmente, para aliviar el dolor.

15 16. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como un medio de obtención de imágenes de RMI.

17. Una construcción de acuerdo con las reivindicaciones 1-9 para su uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades tumorales.

Figura 1

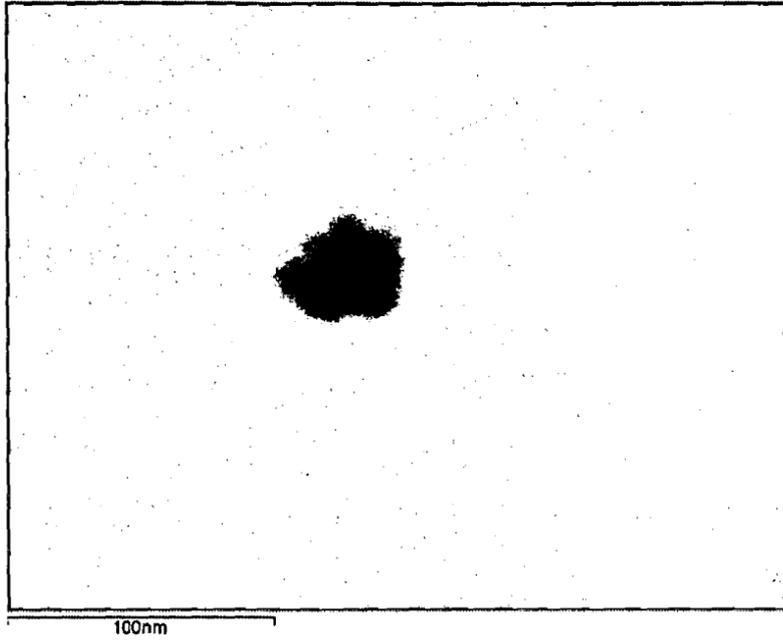


Figura 2

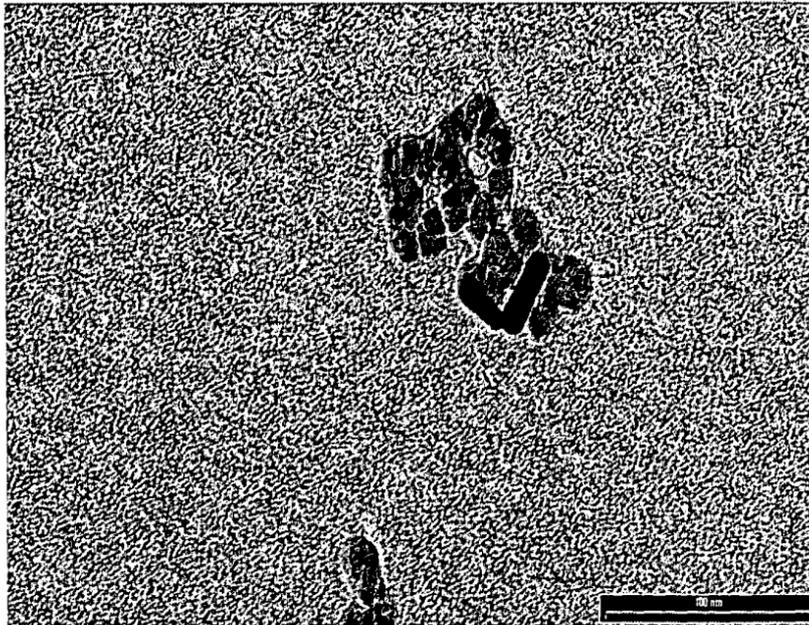


Figura 3

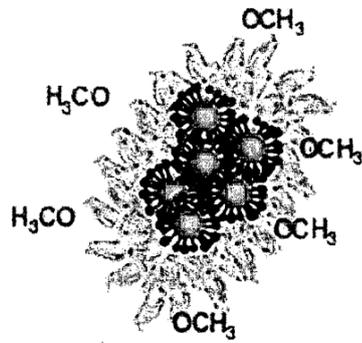


Figura 4

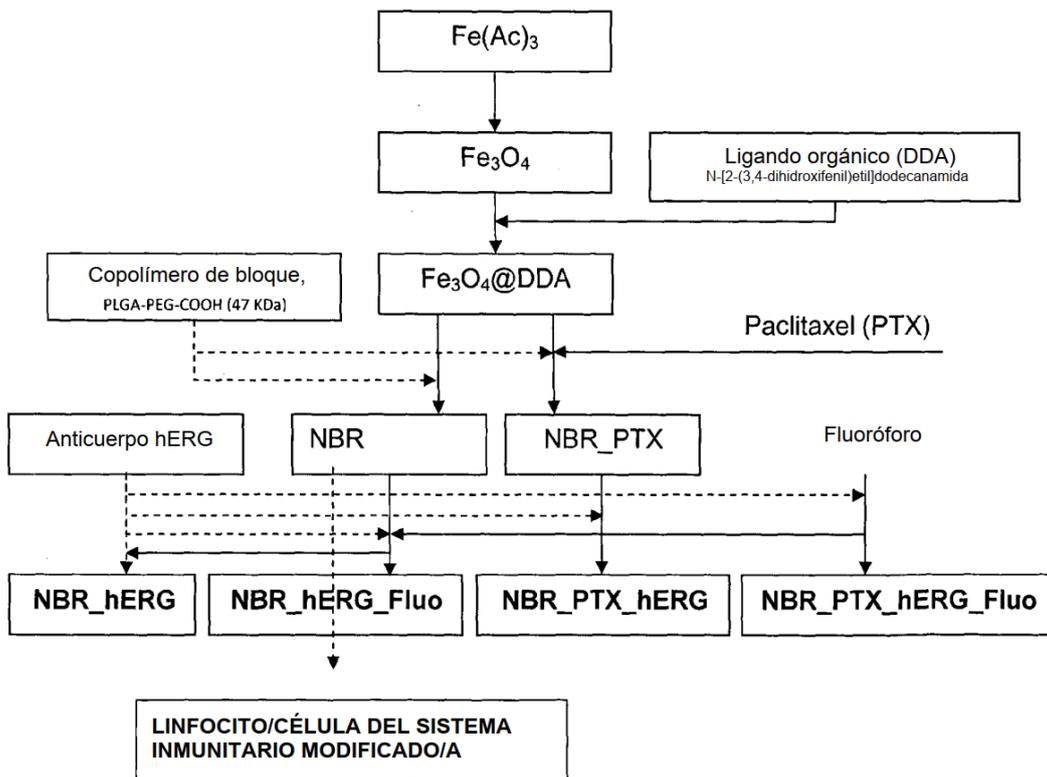


Figura 5

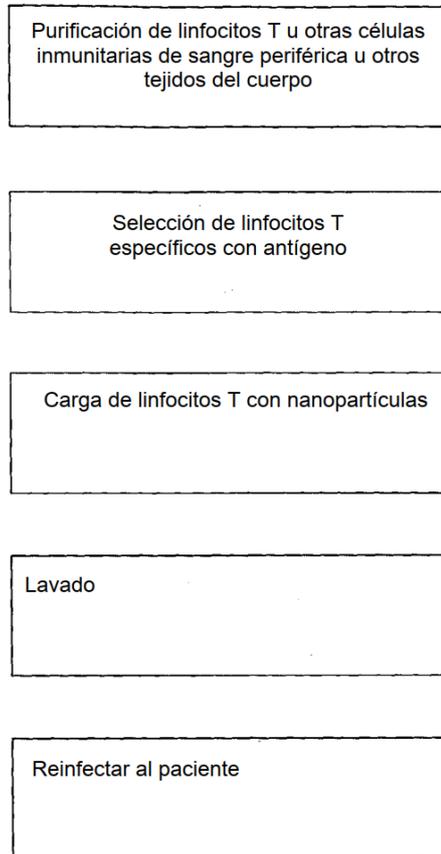


Figura 6

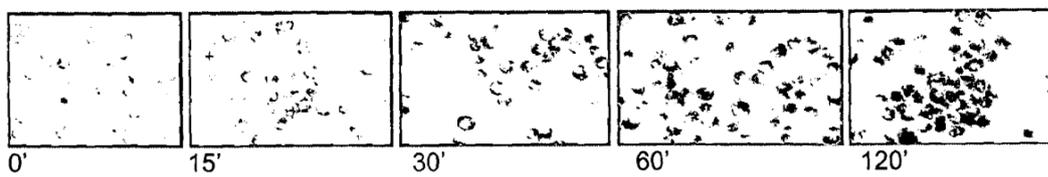


Figura 7

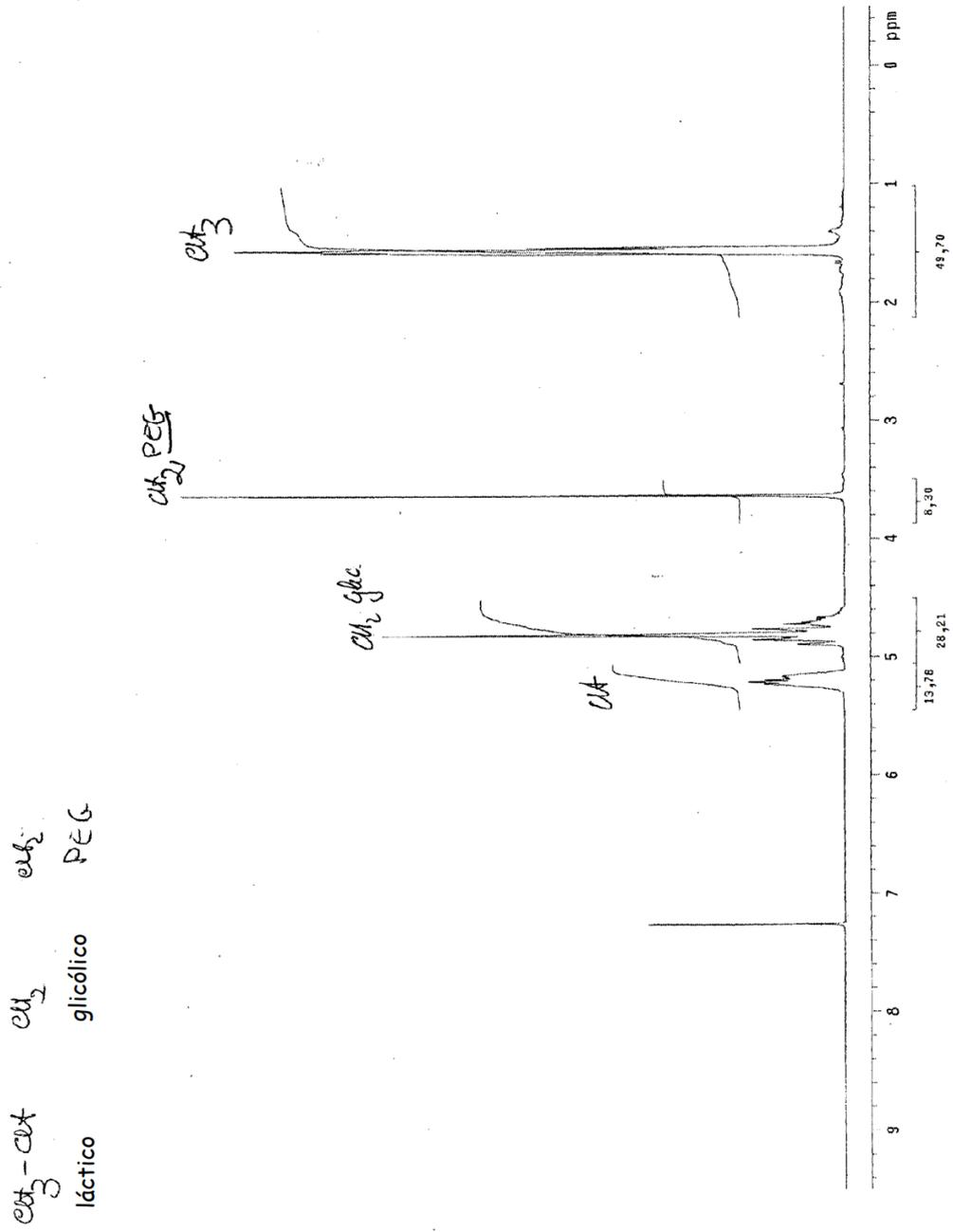
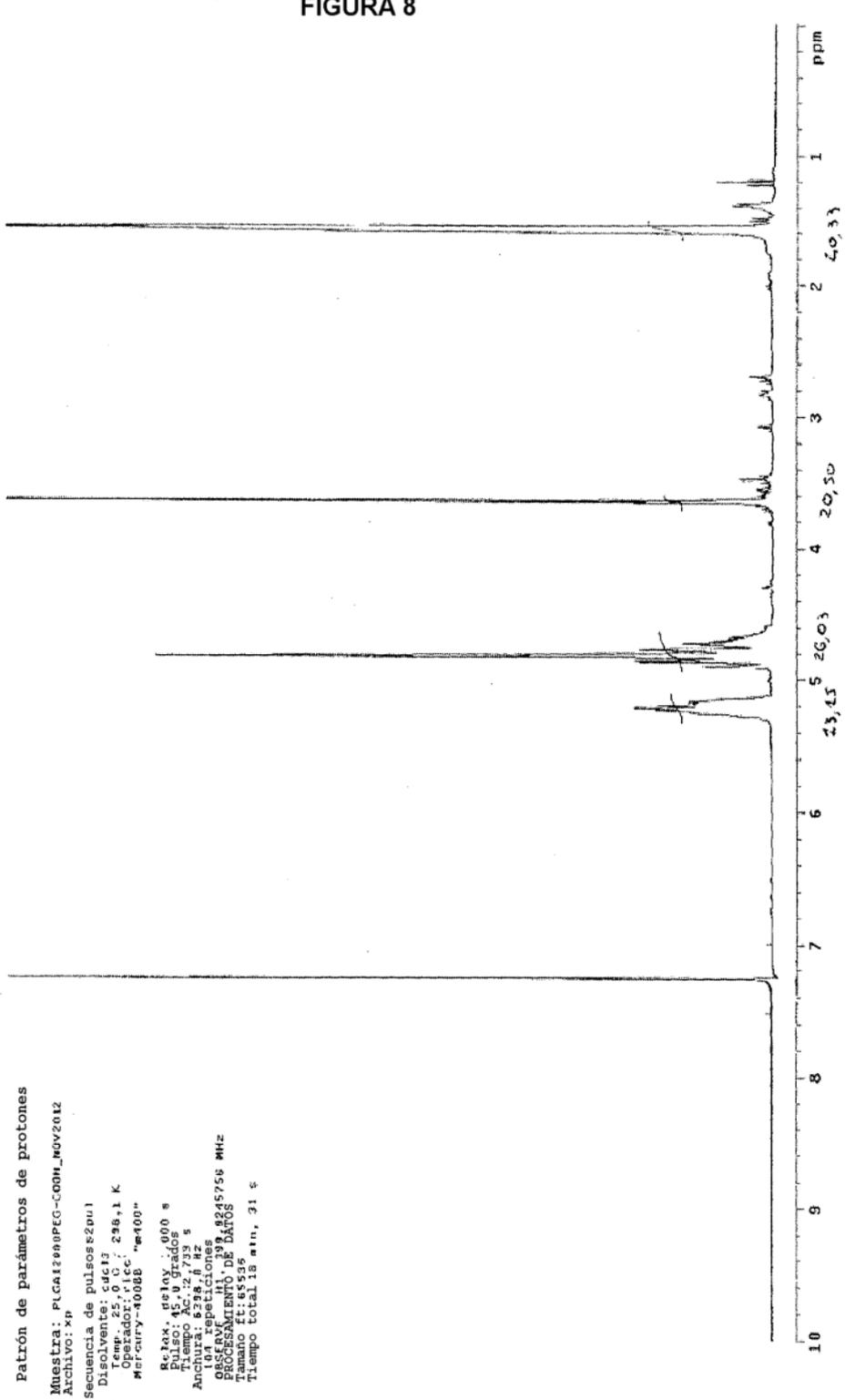
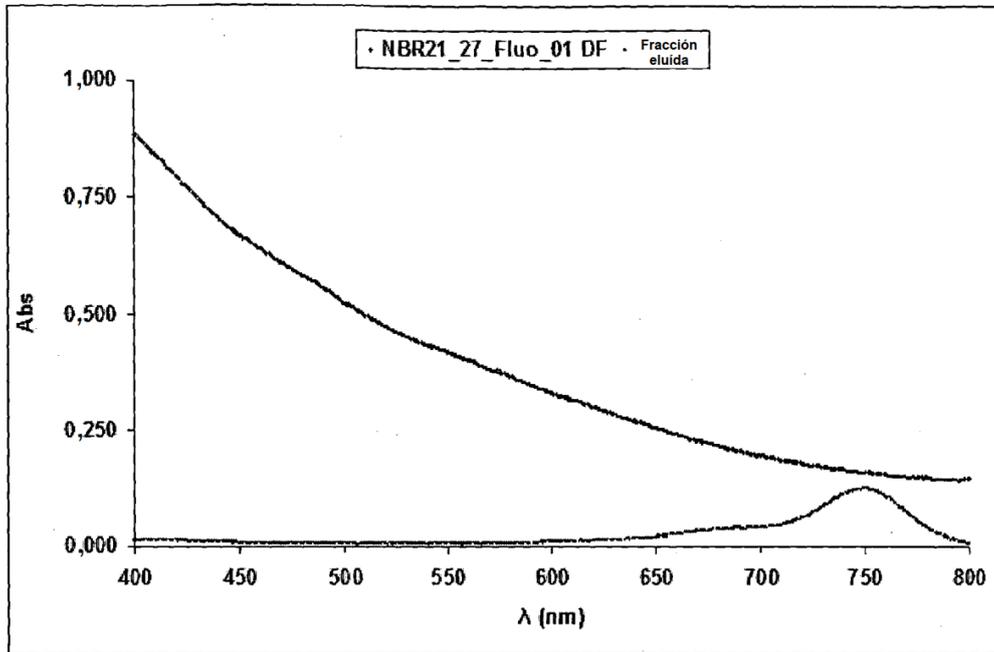


FIGURA 8

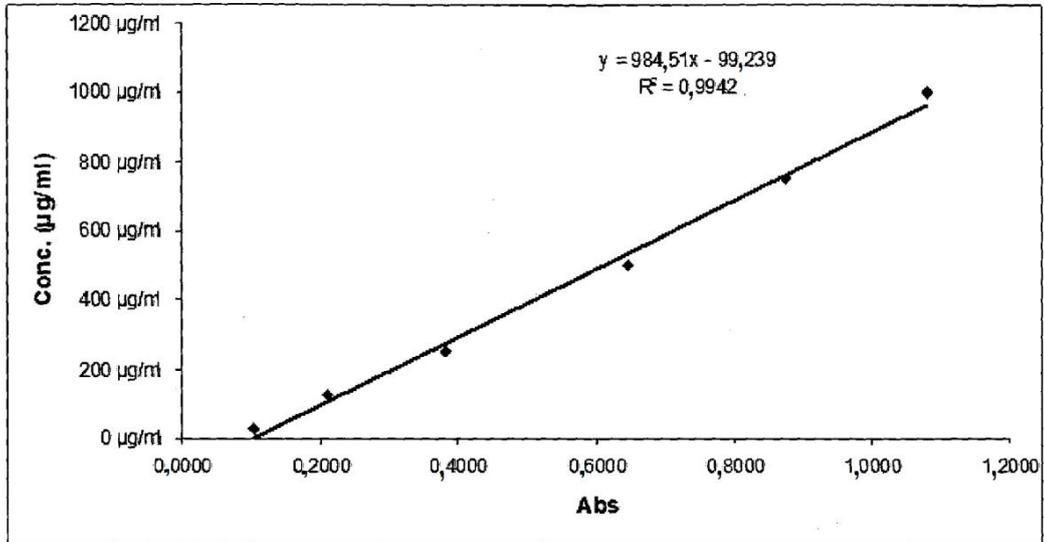


Caracterización RMN-H del polímero
 Desde la derecha, se pueden encontrar las siguientes señales: 1,6 ppm láctico CH3-3,6-ppm CH2 PEG- 4,8 ppm glicólico CH2 -5,2 ppm láctico CH



UV- VIS R0368/2013

FIGURA 9



Prueba BCA

mAb fracción eluída = slq

mAb NBR_PTX = 280 µg/ml

mAb NBR_PTX = 614 µg/ml

mAb eficaz (mAb NBR_PTX - mAb NBR_PTX) = 334 µg/ml

Relación de mAb/Fe₃O₄ = 0,13 %

FIGURA 10