(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 805 802**

(51) Int. CI.:

A61K 9/50 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/76 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2014 PCT/US2014/034723**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14172685**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2014 E 14785811 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2986282**

(54) Título: **Recubrimientos a nanoescala para la encapsulación de entidades biológicas**

(30) Prioridad:

18.04.2013 US 201361813612 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

(72) Inventor/es:

ORTAC, INANC;
YONG, GEN;
BENCHIMOL, MICHAEL y
ESENER, SADIK, C.

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Recubrimientos a nanoescala para la encapsulación de entidades biológicas

Campo técnico

Este documento de patente se refiere a materiales a nanoescala y nanotecnologías.

Antecedentes

La nanotecnología proporciona técnicas o procedimientos para fabricar estructuras, dispositivos y sistemas con elementos a una escala molecular o atómica, por ejemplo, estructuras en un intervalo de uno a cientos de nanómetros en algunas aplicaciones. Por ejemplo, los dispositivos a nanoescala pueden configurarse en tamaños similares a algunas moléculas grandes, por ejemplo, biomoléculas tales como enzimas. Los materiales de tamaño nanométrico usados para crear una nanoestructura, un nanodispositivo o un nanosistema pueden exhibir diversas propiedades únicas, por ejemplo, incluidas propiedades ópticas, que no están presentes en los mismos materiales a mayores dimensiones y dichas propiedades únicas pueden explotarse para una amplia gama de aplicaciones.

A lo largo del documento WO2005057163 se divulga un procedimiento para fabricar nanopartículas huecas, que comprende a) proporcionar una cantidad de un polielectrolito que tiene una carga, b) proporcionar una cantidad de un contraión que tiene una valencia de al menos 2, c) combinar el polielectrolito y el contraión en una solución de manera que el polielectrolito se autoensambla para formar agregados esféricos, y d) añadir nanopartículas a la solución de manera que las nanopartículas se disponen alrededor de los agregados esféricos.

Sumario

Se describen técnicas, sistemas, dispositivos y materiales para encapsular entidades biológicas con la preservación de su actividad biológica.

En un aspecto, un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para producir un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva incluye formar una estructura intermedia mediante la unión de un material polimérico con una sustancia biológica en base a una fuerza electrostática, en la que la estructura intermedia formada incluye una pluralidad de regiones que presentan una carga superficial neta, y formar una estructura de recubrimiento de un material biocompatible directamente sobre la estructura intermedia formada para encerrar la sustancia biológica, en la cual la estructura de recubrimiento preserva la actividad biológica de la sustancia biológica encerrada en la misma, lo que produce de esta manera un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

En otro aspecto, un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva de acuerdo con la reivindicación 11 incluye una estructura del material interior que incluye un material polimérico y una sustancia biológica que están unidos entre sí a través de una interacción electrostática, en la que la estructura del material interior incluye una pluralidad de regiones que presentan un carga superficial neta, y una nanoestructura exterior formada de un material biocompatible para encapsular el material estructurado interior, lo que preserva por lo tanto la actividad biológica de la sustancia biológica encapsulada.

En otro aspecto, un procedimiento para encapsular una sustancia biológica incluye formar un material biocompatible en una estructura biológica para formar una estructura de recubrimiento que encierra la estructura biológica, donde la estructura de recubrimiento tiene un tamaño en el intervalo de nanómetros, en la que la estructura biológica preserva la actividad biológica dentro de la estructura de recubrimiento. En algunas implementaciones del procedimiento, la estructura biológica incluye un virus y el material biocompatible incluye sílice.

El objeto de la patente descrito en este documento de patente puede implementarse de maneras específicas que proporcionan una o más de las siguientes características. Los procedimientos divulgados pueden implementarse para encapsular entidades biológicas u otras sustancias dentro de una matriz sintética, por ejemplo, tal como sílice en un formato de nanopartículas, donde las bioentidades encapsuladas no tienen ninguna pérdida o con una pérdida mínima de su actividad. La matriz nanoestructurada sintetizada (por ejemplo, la carcasa de nanopartículas de sílice) proporciona la capacidad de dirigir la liberación de los productos biológicos, por ejemplo, a través de un mecanismo activado externamente y/o la incorporación de restos de direccionamiento a la matriz nanoestructurada sintetizada. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir cambiar eficazmente la carga superficial en la entidad biológica a través de una reacción cruzada con un polímero catiónico como la poli-L-lisina. El procedimiento puede incluir una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de las entidades biológicas, por ejemplo, mediante la formación de un recubrimiento de matriz de sílice envolvente alrededor de los productos biológicos lo que da lugar a una nanopartícula. En algunas implementaciones, por ejemplo, un agente sensibilizante tal como emulsiones de fluorocarbono puede usarse como centros de cavitación activados por ultrasonido y encapsularse conjuntamente con las entidades biológicas, por ejemplo, unido a la entidad biológica antes de la reacción de condensación sol-gel de sílice ejemplar para permitir que se incorpore un mecanismo de liberación activado externamente en la nanopartícula. Por ejemplo, una vez que se forma la

nanopartícula, pueden realizarse modificaciones superficiales adicionales a la nanopartícula mediante el uso de diversos productos químicos, lo que incluye la química del silano para añadir una variedad de características funcionales a la nanopartícula, lo que incluye, pero no se limita a, polietilenglicol (PEG) para la evasión de la respuesta inmunitaria, restos de direccionamiento para el suministro o liberación específicos, restos de monitoreo ambiental (por ejemplo, redox, hipóxicos, ácidos, etcétera) para liberación dirigida. Dado que la matriz nanoestructurada sintética ejemplar evita que las entidades biológicas encapsuladas se expongan directamente a las condiciones del suero y el tejido antes de liberarse, las entidades biológicas encapsuladas están protegidas de las condiciones degradantes presentes en el suero, por ejemplo, lo que permite una vida media de actividad in vivo mejorada. Además, por ejemplo, la capacidad de activar selectivamente la liberación de los productos biológicos da como resultado una toxicidad sistémica más baja que da lugar a un régimen de terapia mejor tolerado.

Por ejemplo, la nanoestructura de recubrimiento biocompatible divulgada puede funcionalizarse fácilmente y utilizarse para encapsular entidades biológicas tales como virus (por ejemplo, adenovirus). Las implementaciones ejemplares mediante el uso del análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para caracterizar nanoestructuras de recubrimiento ejemplares muestran partículas discretas monodispersas con elementos a nanoescala. Las implementaciones ejemplares mostraron, además, que los virus recubiertos de nanoestructura ejemplares conservaron la capacidad de transducción y se protegieron de la proteinasa k y los anticuerpos neutralizantes. Adicionalmente, por ejemplo, las implementaciones de la tecnología divulgada mostraron la capacidad de eliminar la captación del virus recubierto ejemplar al funcionalizar el recubrimiento ejemplar con polietilenglicol (PEG). Por ejemplo, la conjugación posterior de cRGD al recubrimiento ejemplar rescató la capacidad de transducción de los virus. El recubrimiento ejemplar es robusto y el virus recubierto puede almacenarse a -80 °C sin pérdida de actividad. Las aplicaciones de la tecnología divulgadas pueden incluir, pero no se limitan a, biotecnología y biomedicina, por ejemplo, tal como en el tratamiento y monitoreo de numerosas enfermedades, lo que incluye cáncer, diabetes, entre otras. Por ejemplo, la tecnología divulgada puede usarse como un enfoque terapéutico para la traducción clínica con el objetivo de ampliar el uso de virus oncolíticos a más aplicaciones terapéuticas contra el cáncer y mejorar las tasas de respuesta clínica de los virus oncolíticos. Además, la plataforma de nanorrecubrimiento divulgada puede permitir enfoques basados en terapia génica adicionales dirigidos al metabolismo del cáncer y otras enfermedades con base genética.

Esas y otras características se describen con mayor detalle en los dibujos, la descripción y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra un diagrama ilustrativo del procedimiento ejemplar para un procedimiento de encapsulación dirigido por plantilla a nanoescala de entidades biológicas que preserva la actividad biológica.
La Figura 1B muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de un recubrimiento de nanoestructura de sílice ejemplar de un virus.
Las Figuras 2A-2C muestran gráficos de datos e imágenes de implementaciones ejemplares mediante el uso del recubrimiento de nanoestructura de sílice ejemplar para encapsular virus.
La Figura 3 muestra un diagrama de procedimiento de un procedimiento ejemplar para la encapsulación conjunta de entidades biológicas con restos de direccionamiento en la carcasa de la nanoestructura.
La Figura 4 muestra gráficos de datos de un ensayo de neutralización ejemplar en presencia de anticuerpos.
La Figura 5 muestra un gráfico de datos de implementaciones ejemplares para el redireccionamiento de la entidad biológica recubierta de sílice ejemplar.
La Figura 6 muestra gráficos de datos que representan la liberación activada por ultrasonido de adenovirus desde los recubrimientos nanoestructurados ejemplares.

Descripción detallada

La terapia viral oncolítica es una terapia contra el cáncer que usa virus para replicarse selectivamente en células tumorales y destruirlas. En las últimas dos décadas, se ha logrado un progreso significativo en el desarrollo preclínico y clínico de la terapia con base viral como una plataforma para el tratamiento del cáncer. Si bien desde entonces se ha progresado mucho en la comprensión de los ciclos vitales y la biología virales, sus características de suministro y aclaramiento permanecen como un obstáculo importante para una terapia eficaz. Por ejemplo, algunos pacientes montan una respuesta inmunitaria a la terapia viral, por ejemplo, lo que puede provocar y aumentar los efectos secundarios en el tratamiento del paciente, y en general, limita la eficacia clínica de este enfoque terapéutico. Los procedimientos actuales para abordar los desafíos de las técnicas de terapia viral, tales como la respuesta inmunitaria, se enfocan en la modificación directa del virus o la encapsulación. Además, las condiciones severas de reacción química durante el tratamiento también afectan la viabilidad de la terapia viral. Por ejemplo, la eficacia de la terapia viral depende, además, de la afinidad natural de los vectores virales por las células objetivo (por ejemplo, tropismo de la célula huésped). Se cree que la capacidad de suministrar eficazmente virus terapéuticos de forma sistémica necesita tecnología para abordar estos desafíos y de esta manera, expandir la eficacia de la plataforma viral oncolítica a pacientes con enfermedad diseminada.

Se describen técnicas, sistemas, dispositivos y materiales para encapsular entidades biológicas mediante el uso de diseños de materiales a nanoescala y la funcionalización especializada. Las implementaciones de la tecnología

divulgada incluyen nanorrecubrimientos biocompatibles que preservan la bioactividad de una carga útil viral y protegen la carga útil viral del reconocimiento inmunitario y la neutralización durante el tratamiento con terapia viral, con direccionamiento específico, circulación mejorada y capacidades teranósticas.

En algunos aspectos, la tecnología divulgada incluye un procedimiento de fabricación de plantillas a nanoescala para encapsular una entidad biológica (por ejemplo, tal como un virus) en una carcasa nanoestructurado (por ejemplo, tal como una estructura de recubrimiento de nanopartículas). Además de encapsular la entidad biológica, la carcasa nanoestructurada también tiene la capacidad de dirigir la liberación de la entidad biológica a través de un activador externo y/o la incorporación de restos de direccionamiento en la carcasa de la nanoestructura. Por ejemplo, la tecnología divulgada puede aplicarse en una variedad de campos en biomedicina y biotecnología, por ejemplo, lo que incluye las terapias virales.

En algunas implementaciones, un vector viral puede encapsularse en un recubrimiento de nanopartículas a base de sílice estructurado para proporcionar un mecanismo de liberación controlada para dirigir la liberación de la carga útil del virus, in vitro e in vivo, mediante el uso de un activador externo y/o restos objetivo incorporados. En algunos ejemplos, puede aplicarse una señal acústica externa al recubrimiento nanoestructurado ejemplar que contiene el vector viral para provocar la liberación del vector viral en un sitio objetivo dentro de un organismo, por ejemplo, tal como en un tumor dentro de un animal.

Se describen implementaciones ejemplares mediante el uso de adenovirus encapsulados mediante las estructuras ejemplares de nanorrecubrimiento de sílice, por ejemplo, que confieren protección contra la proteinasa K. Por ejemplo, los resultados de las implementaciones ejemplares como se muestran en la presente memoria demostraron la activación mediante el uso de ultrasonido de la transfección viral en una línea celular pancreática humana. En otras implementaciones, por ejemplo, el enfoque de encapsulación divulgado puede adoptarse para materiales distintos de sílice, por ejemplo, lo que incluye, pero no se limita a, óxido de titanio y fosfato de calcio.

En algunas implementaciones, por ejemplo, el recubrimiento ejemplar de nanopartículas a base de sílice puede formarse mediante la condensación directa de una matriz de sílice desmontable en la superficie de las entidades biológicas para formar la nanopartícula a la vez que se preserva la actividad biológica. Mediante el uso de las técnicas de fabricación divulgadas, por ejemplo, la matriz de sílice ejemplar puede formarse directamente en la superficie de las entidades biológicas en condiciones de reacción biológicamente compatibles. Esto permite una mayor eficiencia de encapsulación sin la consiguiente pérdida de actividad de las entidades biológicas. Esto proporciona, además, un control fino sobre el tamaño de partícula, lo que da nanopartículas con características de tamaño bien definidas. Por ejemplo, puede usarse sílice para formar el recubrimiento de nanoestructura, por ejemplo, particularmente en aplicaciones biológicas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Adicionalmente, por ejemplo, la tecnología divulgada puede incluir un agente sensibilizante dentro de la estructura sintetizada para permitir la liberación activada externamente de las entidades biológicas encapsuladas, así como también procedimientos ejemplares para la funcionalización de la nanopartícula para características ejemplares como tiempo de circulación y direccionamiento mejorados que se benefician de la fácil funcionalización de la superficie de sílice.

En algunos aspectos, la tecnología divulgada incluye un procedimiento de encapsulación de entidades biológicas y sustancias biológicas dentro de una matriz sintética, por ejemplo, tal como sílice en un formato de nanopartículas, sin ninguna pérdida o con una pérdida mínima de actividad de las entidades o sustancias biológicas. Por ejemplo, la carcasa de matriz sintética producida (por ejemplo, nanopartícula) que encapsula las entidades o sustancias biológicas puede configurarse para que tenga la capacidad de liberar selectivamente las entidades o sustancias biológicas a través de un mecanismo activado externamente y/o la incorporación de restos de direccionamiento a la carcasa de la matriz sintética. Por ejemplo, el procedimiento ejemplar puede incluir un procedimiento para moldear sílice sobre entidades biológicas, por ejemplo, virus, a la vez que se preserva la actividad biológica/compatible con la vida. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir un procedimiento para cambiar la carga superficial en las entidades biológicas, por ejemplo, a través de la reacción cruzada con un sustrato policatiónico (por ejemplo, tal como la poli-l-lisina) a una superficie cargada positivamente compatible con el procedimiento de policondensación de sílice. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir un procedimiento para implementar una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de las entidades o sustancias biológicas lo que forma un recubrimiento de matriz de sílice envolvente alrededor de las entidades biológicas o sustancias lo que da lugar a una nanopartícula. Por ejemplo, puede incluirse un agente sensibilizante tal como emulsiones de fluorocarbono como centros de cavitación activados por ultrasonido antes de la reacción de condensación sol-gel de sílice para permitir que se incorpore un mecanismo de liberación activado externamente en la partícula. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir un procedimiento para encapsular un fármaco o un agente terapéutico con la entidad biológica. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir un procedimiento para incluir óxido de hierro u otros materiales (de una naturaleza de nanopartícula) en el recubrimiento de sílice producido, por ejemplo, para la obtención de imágenes. Una vez que se forma la nanopartícula, por ejemplo, el procedimiento puede incluir la implementación de modificaciones adicionales de la superficie a la nanopartícula mediante el uso de diversas químicas, por ejemplo, incluida la química del silano para añadir una variedad de características funcionales a la nanopartícula, por ejemplo, tal como PEG para la evasión inmunitaria, restos de direccionamiento para el suministro o liberación específicos, restos de monitoreo

ambiental (por ejemplo, redox, hipóxicos, ácidos, etcétera) para liberación dirigida, entre otros. Por ejemplo, dado que los productos biológicos no se exponen directamente a las condiciones del suero y del tejido antes de ser liberados, los productos biológicos encapsulados se protegen de las condiciones degradantes presentes en el suero, lo que permite una vida media de actividad in vivo mejorada. Por ejemplo, la capacidad de activar selectivamente la liberación de los productos biológicos da como resultado una toxicidad sistémica más baja lo que da lugar a un régimen de terapia mejor tolerado. En algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir la estabilización de la entidad biológica encapsulada que permite una estabilidad térmica mejorada de -80 °C a -37 °C. Por ejemplo, puede realizarse la liofilización o el secado por punto crítico de la nanopartícula a la vez que se preserva la actividad biológica de la entidad encapsulada.

La Figura 1A muestra un diagrama ilustrativo del procedimiento ejemplar para un procedimiento de encapsulación dirigido por una plantilla a nanoescala de entidades biológicas que preserva la actividad biológica de las entidades biológicas encapsuladas. El procedimiento incluye un procedimiento para formar una estructura de biomaterial intermedia 105 mediante la unión de un material cargado superficialmente 101 con una entidad o sustancia biológica 102 de manera que la estructura de biomaterial intermedia formada 105 presenta regiones que tienen una carga superficial neta, por ejemplo, que puede modificarse a partir de la entidad biológica o sustancia 102. Por ejemplo, como se ilustra en el diagrama de la Figura 1A, un virus cargado negativamente (por ejemplo, adenovirus) se hace reaccionar con un polímero catiónico, poli-L-lisina (PLL), para modificar la carga superficial en el adenovirus, por ejemplo, en el que el PLL se une a la superficie del adenovirus mediante una fuerza electrostática. El procedimiento incluye un procedimiento para formar una nanoestructura con una entidad biológica encapsulada 110 mediante la formación de un recubrimiento de nanoestructura 109 para encerrar la estructura de biomaterial intermedia 105, en la que la bioentidad o sustancia encapsulada 102 mantiene su funcionalidad de bioactividad. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1A, la estructura de material viral cargada positivamente ejemplar atrae precursores de sílice cargados negativamente e iones hidroxilo lo que crea un ambiente básico adecuado para una reacción de policondensación de sílice para formar el recubrimiento de nanoestructura (por ejemplo, nanopartículas a base de sílice) que encapsula la carga útil viral. La Figura 1B muestra una imagen de SEM de un nanorrecubrimiento de sílice ejemplar de dichos virus (por ejemplo, denominada como una plataforma siVirus).

Por ejemplo, la química del silano es típicamente compatible con las condiciones fisiológicas. Los procedimientos divulgados pueden manipular la química del silano para lograr el recubrimiento de virus en nanopartículas de sílice sin ninguna pérdida consiguiente de actividad biológica de los virus, como se muestra más adelante en las Figuras 2A-2C. Los procedimientos tradicionales de síntesis de sol gel usan pH alcalino, catálisis ácida o adición de sales. La gelificación posterior se produce en masa en la fase líquida con procesamiento aguas abajo y el envejecimiento del gel para formar composiciones de sílice. Mediante el uso de los procedimientos de fabricación divulgados, la reacción de sol-gel se produce a pH neutro y se convierte en dirigida por plantilla donde la matriz de nanomaterial (por ejemplo, la matriz de sílice ejemplar) se forma directamente en la superficie de la entidad biológica a encapsular en condiciones de reacción biológicamente compatibles.

En algunas implementaciones, por ejemplo, se usa una plantilla cargada como punto de partida inicial de la reacción. En dependencia de la carga superficial inicial de la plantilla, la plantilla se vuelve a funcionalizar para portar una carga positiva neta o parcial a través de la interacción electrostática con un polímero policatiónico como la poli-L-lisina, por ejemplo, lo que forma de esta manera una estructura de material bioplantilla. Después, se añade ácido silícico a la mezcla de reacción en una concentración donde la nucleación de gelificación en masa de sílice a partir de sol se produce lentamente. Se produce la absorción de ácido silícico a la superficie de la plantilla. Cuando la concentración local de iones de ácido silícico en la superficie de la plantilla supera el umbral para la nucleación de gel de sílice, se produce una policondensación autolimitante en la superficie de la plantilla que encierra la plantilla en una matriz de gel de sílice. Por ejemplo, la plantilla inicial puede acompañarse de restos funcionales adicionales para la encapsulación conjunta. La reacción se produce en condiciones fisiológicas y permite una mayor eficiencia de encapsulación sin la consiguiente pérdida de actividad de los productos biológicos. Esto proporciona, además, un control fino sobre el tamaño de partícula, lo que da nanopartículas con características de tamaño bien definidas. Adicionalmente, por ejemplo, el recubrimiento de sílice puede aceptar fácilmente funcionalizaciones secundarias para lograr una amplia gama de propiedades del material.

El procedimiento ejemplar puede incluir un procedimiento de fabricación de productos químicos en húmedo mediante el uso de la química sol-gel de sílice que usa una solución coloidal (sol) como un precursor para una red integrada (gel) de partículas discretas o una red de sílice amorfa, por ejemplo, tales como:

$$Si(OCH_3)_4 + 2H_2O \rightarrow SiO_2 + 4\ CH_3OH.$$

Los ejemplos de restos funcionales posibles para funciones adicionales incluyen, pero no se limitan a, nanoemulsiones para activación por ultrasonido, fármacos de quimioterapia como doxorrubicina, fármacos terapéuticos estándar como estatinas, compuestos terapéuticos como inhibidores de moléculas pequeñas, vectores de ADN, vectores de ARN para ARNhc y ARNi, microARN y agentes de contraste para MRI como el gadolinio y colorantes para contraste radiológico.

Los ejemplos de funcionalizaciones secundarias incluyen, pero no se limitan a, PEG, PEG sensible al pH, aficuerpos, anticuerpos, IgG, IgM, ligandos de direccionamiento como VEGF-C, cRGD y folato, ADN y aptámeros, proteínas, lipoproteínas, apolipoproteínas, glicoproteínas, glicanos, carbohidratos, sacáridos y oligosacáridos, polímeros y oligómeros, y lípidos.

La tecnología de nanoencapsulación dirigida por plantilla divulgada preserva la actividad biológica de proteínas, enzimas, vectores de ADN, virus, bacterias y otros agentes biológicos sensibles que de otra manera no podrían mantener la actividad biológica in vivo para proporcionar un grado de protección al agente encapsulado. En algunas implementaciones, la tecnología actual incluye un procedimiento de policondensación de sílice dirigido por plantilla para producir partículas bien definidas con características de tamaño controlables en el régimen de nanoescala. Por ejemplo, el procedimiento de policondensación de sílice dirigido por plantilla incluye crear la plantilla de sílice directamente en el agente a encapsular, lo que puede permitir la encapsulación de una amplia gama de agentes sin restricciones de tamaño con muy altas eficiencias. Las estructuras de nanomateriales divulgadas pueden producirse y utilizarse como (1) un recubrimiento biocompatible que permite la evasión del sistema inmunitario y la protección contra la degradación; y (2) un andamio para incorporar restos funcionales adicionales, por ejemplo, para redirigir el virus, disminuir la afinidad bioquímica para inhibir la adhesión y la captación (por ejemplo, PEGilación, carga, zwitteriónico), aumentar la afinidad bioquímica con ligandos de direccionamiento (por ejemplo, AcM), o permitir la activación por ultrasonido (por ejemplo, nanopartículas de perfluorocarbono, sitio de nucleación de cavitación).

En algunas implementaciones ejemplares de la tecnología divulgada, los virus se encapsularon en estructuras con nanorrecubrimiento de sílice.

Los virus son sistemas altamente evolucionados con transferencia génica y mecanismos líticos que pueden usarse para aplicaciones medicinales. Sin embargo, puede haber algunos aspectos técnicos que deben abordarse en dichas aplicaciones. Por ejemplo, el sistema inmunitario puede ser una barrera para estos enfoques, a través de su capacidad para reconocer estos virus, neutralizarlos y/o acelerar su aclaramiento y degradación. Además, por ejemplo, el tropismo por células huésped específica de los virus limita su aplicación a poblaciones de células específicas. En este contexto de un virus y otros patógenos que afectan a un tropismo por huésped o al tropismo celular, el tropismo se refiere a la manera en que diferentes virus/patógenos han evolucionado para dirigirse preferentemente a especies específicas de huésped o tipos de células dentro de una especie.

Mediante el uso de los virus oncolíticos como un ejemplo, los virus oncolíticos pueden replicarse selectivamente en y destruir las células tumorales, y en las últimas dos décadas se ha logrado un progreso significativo en el desarrollo preclínico y clínico de la terapia con base viral como una plataforma para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el uso de Onyx-015 demostró la seguridad de este enfoque, y se observaron respuestas significativas entre los pacientes tratados con inyecciones intralesionales y el suministro vascular regional. Sin embargo, la inducción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes, así como también altos niveles de citocinas antivirales, se demostró entre los pacientes con cáncer tratados con Onyx-015, lo que limita la eficacia de este enfoque mediante el suministro sistémico. A pesar de estas limitaciones, se persiguen enfoques intratumorales y regionales en grandes estudios multinacionales con evidencia creciente de éxito en melanoma y carcinoma hepatocelular. Si bien se ha progresado mucho en la comprensión de los ciclos vitales y la biología virales, sus características de liberación y aclaramiento permanecen como un obstáculo importante para una terapia eficaz. El cuerpo humano es extremadamente eficaz en el aclaramiento de la mayoría de los patógenos de la circulación. Si bien puede tolerar una dosis inicial de virus para la terapia, las dosis de seguimiento se eliminan rápidamente con poco beneficio terapéutico. Adicionalmente, el aspecto del tropismo de la célula huésped limita la utilidad de los virus solo a las células con las que tienen afinidad. Abordar los aspectos de la activación inmunitaria y el tropismo de la célula huésped sería clave para avanzar en la terapia viral. Las implementaciones de la tecnología divulgada proporcionan la capacidad de suministrar eficazmente virus terapéuticos de manera sistémica y expandir la eficacia de una plataforma viral oncolítica a pacientes con enfermedad diseminada.

El problema de la activación inmunitaria después de la terapia viral ha sido difícil de superar. Por ejemplo, se ha demostrado en modelos animales que la exposición previa a un virus dado limita el resultado terapéutico en ratones. Los ensayos clínicos de terapia viral en humanos han observado la inducción de altos títulos de anticuerpos neutralizantes y niveles elevados de citocinas, lo que limitaría las posibilidades para su uso in vivo. Por ejemplo, los virus actualmente en ensayos clínicos son derivados de patógenos humanos comunes a los que los humanos se exponen regularmente. La exposición previa a estos virus complica la interpretación del resultado clínico y niega la posibilidad de repetir la terapia para eliminar la enfermedad residual. Una preocupación secundaria que surge a partir de la activación inmunitaria es el corto tiempo de persistencia en sangre y la biodisponibilidad de los virus terapéuticos. La velocidad a la que los virus se eliminan del sistema inmunitario impide el suministro sistémico general de virus terapéuticos. La mayoría de los enfoques convencionales (por ejemplo, en ensayos clínicos) se enfocan en el suministro intratumoral, intralesional o intraarterial de virus para la terapia regional. La incapacidad para lograr un suministro sistémico impide la capacidad de tratar adecuadamente las enfermedades diseminadas y sistémicas. Las limitaciones en la dosificación repetida y la ausencia de una verdadera opción de terapia sistémica a partir de la activación inmunitaria es un primer obstáculo primordial que debe cruzarse para una mayor comprensión clínica de la terapia viral.

El problema del tropismo por la célula huésped es particularmente problemático porque involucra tres áreas de terapia, por ejemplo, los objetivos terapéuticos que pueden tratarse, la expresión variable del receptor entre pacientes y las toxicidades fuera de objetivo. Así como el virus de la gripe que infecta normalmente los tejidos pulmonares tendría dificultades para afianzarse en la próstata o el páncreas, los individuos dentro de una población dada tienen diferentes susceptibilidades a sistemas virales diferentes. Los receptores que usan los virus para ingresar a una célula tienen niveles de expresión muy variables en las células cancerosas, lo que puede conducir a toxicidades fuera de objetivo en tejidos con altos niveles de expresión de estos receptores (las toxicidades esplénicas y del hígado a menudo están implicadas).

La tecnología divulgada aborda el aspecto de la activación inmunitaria y es capaz de redirigir los virus a marcadores celulares que se sobreexpresan en condiciones de enfermedad y expandir la eficacia de la plataforma viral. Por otra parte, la tecnología divulgada abre el uso de virus a más aplicaciones terapéuticas para mejorar las tasas de respuesta clínica. Además, la plataforma siVirus divulgada permite enfoques basados en terapia génica adicionales dirigidos al metabolismo del cáncer y otras enfermedades con base genética.

Cambiar la superficie de interacción que un virus presenta al cuerpo impacta el tipo de respuesta que provoca a partir de procedimientos aguas abajo, tales como las respuestas del sistema inmunitario y la captación celular. En algunas realizaciones de la tecnología de nanorrecubrimiento divulgada, se usa sílice, ya que se presta bien como un material de recubrimiento para virus debido a su biocompatibilidad favorable, características de degradación y química de silano flexible que permite una modificación simple del recubrimiento de sílice. Las implementaciones ejemplares mediante el uso de las estructuras de nanorrecubrimiento de sílice ejemplares indican que el recubrimiento de adenovirus con sílice mejoró su capacidad de transducción donde la capa de sílice se degrada rápidamente en condiciones endosómicas. Los virus recubiertos de sílice están protegidos, además, contra anticuerpos neutralizantes y la proteinasa K.

La tecnología divulgada puede usarse para cambiar la superficie de interacción que un virus presenta al cuerpo e impacta el tipo de respuesta que provoca a partir de procedimientos aguas abajo, como las respuestas del sistema inmunitario y la captación celular. En implementaciones ejemplares realizadas y descritas en la presente memoria, se demuestra la capacidad de incorporar PEG y componentes peptídicos para eliminar la captación celular y lograr la captación mediada por receptores, respectivamente. Por ejemplo, el recubrimiento de sílice ejemplar es robusto y el virus recubierto puede almacenarse a -80 °C sin pérdida de la actividad.

La Figura 2A muestra un gráfico de datos que representa la eficiencia de transducción de una carga útil de bioagente Adenovirus-RFP ejemplar después de recubrirse con una nanoestructura de sílice ejemplar. La intensidad de fluorescencia de RFP se midió dos días después de la transducción con configuraciones normalizadas al nivel MOI 500. Los adenovirus recubiertos de sílice ejemplares mantuvieron la actividad de transducción y se protegieron de la digestión por la proteinasa K. Un recubrimiento secundario ejemplar de PEG sobre la partícula de sílice fue suficiente para eliminar la transducción.

La Figura 2B muestra un gráfico de datos que representa el análisis FACS (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia, mediante el uso de citometría de flujo) de células transducidas con adenovirus-RFP libre o adenovirus-RFP recubierto de sílice. Las células se infectaron con Ad-RFP y después se cosecharon y analizaron en FACS dos días después de la transducción. Tanto el Ad-RFP libre como el recubierto de sílice mostraron una respuesta a la dosis amplia en la población con aumento del título viral.

La Figura 2C muestra una imagen de datos que muestra la actividad in vivo de adenovirus recubiertos de sílice ejemplares. Un ratón C57/B16 nu/nu ejemplar, portador de tumores HT1080 bilaterales, recibió dos inyecciones intratumorales (IT) de 5×10^7 pfu de adenovirus que codifica luciferasa de luciérnaga libre que codifica (Ad-Luc) al tumor derecho y dos dosis IT de 5×10^7 pfu de Ad-Luc recubierto de sílice al tumor izquierdo. La expresión de luciferasa se analizó después de 4 días después de la inyección al dar 50 µl de d-luciferina 0,2 mg/ml IV.

La tecnología divulgada también es capaz de encapsular conjuntamente diversos restos que confieren funcionalidad adicional con nuestros virus. Por ejemplo, puede incluirse una nanoemulsión de perfluorocarbono para permitir la liberación del virus activada por ultrasonido. En una de dichas implementaciones ejemplares del procedimiento para encapsular conjuntamente un resto ejemplar, una emulsión de fluorocarbono se estabiliza mediante un tensioactivo cargado negativamente. La emulsión se hace reaccionar con un polímero catiónico, por ejemplo, tal como poli-L-lisina (PLL), seguido de la adsorción de virus cargados negativamente. Finalmente, la reacción de policondensación de sílice se realiza en la superficie, lo que encapsula la emulsión junto con el virus en sílice.

La Figura 3 muestra un diagrama de procedimiento de un procedimiento ejemplar para la encapsulación conjunta de una o más entidades biológicas con restos de direccionamiento en la carcasa de la nanoestructura, en el que la carcasa de la nanoestructura preserva la actividad biológica de las entidades biológicas encapsuladas a la vez que proporciona un mecanismo de liberación de direccionamiento. El procedimiento incluye un procedimiento para unir un material cargado superficialmente 301 con una sustancia o resto de direccionamiento 302 para formar un complejo del material 303 que presenta carga superficial. Por ejemplo, una nanoemulsión (NE) cargada negativamente puede hacerse reaccionar con un polímero catiónico, por ejemplo, poli-L-lisina (PLL), para formar una

sustancia material que tiene regiones cargadas positivamente en la sustancia que contiene la PLL y la NE basada en el PLL. El procedimiento incluye un procedimiento para formar una estructura de material dirigido a una bioentidad 307 al hacer reaccionar el complejo de material cargado en la superficie 303 con una entidad biológica o sustancia 305, por ejemplo, que une la entidad biológica o sustancia al complejo de material 303 en la carga superficial. Por ejemplo, como se ilustra en el diagrama de la Figura 3, un virus cargado negativamente (por ejemplo, adenovirus) puede hacerse reaccionar con el polímero catiónico, PLL, regiones de la estructura 307, por ejemplo, en el que el adenovirus se une a la superficie de la estructura PLL-NE mediante una fuerza electrostática. La PLL-NE cargada positivamente atrae adenovirus cargados negativamente a su superficie. La reacción de poli-condensación de sílice se realiza en superficie lo que encapsula la emulsión junto con los virus en sílice. El procedimiento incluye un procedimiento para producir una nanoestructura 310 que encapsula conjuntamente una entidad biológica/sustancia de direccionamiento mediante la formación de un recubrimiento de nanoestructura 309 para encerrar la estructura 307. Por ejemplo, la estructura de virus cargado positivamente/PLL-NE ejemplar atrae precursores de sílice cargados negativamente e iones hidroxilo lo que crea un ambiente básico adecuado para la reacción de policondensación de sílice para formar un nanorrecubrimiento de sílice que encapsula la carga útil viral con la sustancia de direccionamiento, por ejemplo, la nanoemulsión.

En algunas implementaciones ejemplares de la tecnología divulgada, los virus y los restos de direccionamiento se encapsularon en estructuras con nanorrecubrimiento de sílice.

Todos los adenovirus usados en las implementaciones ejemplares descritas más abajo no fueron replicativas con deleciones en las regiones E1/E3. Para determinar si el nanorrecubrimiento de sílice ejemplar tuvo un efecto adverso sobre la eficacia de transducción de los adenovirus, se compararon los adenovirus que codifican RFP recubiertos de sílice (Ad-RFP) frente a libres en cultivo celular. Los resultados ejemplares mostraron que los adenovirus recubiertos de sílice no solo mantuvieron la actividad después del recubrimiento sino que también mostraron un aumento de 3 veces en la eficacia de la transducción por sobre los adenovirus libres, por ejemplo, lo que podría ser una indicación temprana de un mecanismo de redireccionamiento. Las implementaciones posteriores mediante el uso del análisis FACS, por ejemplo, indicaron que este era un fenómeno amplio en la población y no el resultado de una pequeña población secundaria de células superinfectadas. Además, las implementaciones ejemplares incluyeron la adición de PEG a la capa de sílice, que se demostró que elimina la transducción por los adenovirus recubiertos de sílice. Los adenovirus encapsulados ejemplares en los nanorrecubrimientos de sílice ejemplares también pueden almacenarse a -80 °C sin ninguna pérdida de bioactividad. Las implementaciones in vivo ejemplares en ratones que mostraron la actividad 3 veces mayor de virus recubiertos llevadas a cabo también se aplicaron in vivo.

Se realizaron implementaciones ejemplares para demostrar la protección de los adenovirus recubiertos de sílice de los anticuerpos neutralizantes. La eficacia de transducción de adenovirus libres y recubiertos se comparó después de la exposición al policlonal anti-hexón Ad5 de cabra (por ejemplo, obtenido de Thermo Scientific PA128357) durante 1 hora a 37 °C. El adenovirus libre mostró una clara neutralización con una concentración inhibitoria 50 % (IC50) de dilución de anticuerpo 5×10^{-3}. El adenovirus recubierto de sílice ejemplar no mostró pérdida de la actividad a la misma concentración de anticuerpo.

La Figura 4 muestra gráficos de datos que representan resultados ejemplares de ensayos de neutralización, en presencia de anticuerpos, para caracterizar la preservación de la bioactividad de las nanoestructuras que encapsulan bioentidades ejemplares. Por ejemplo, se incubaron Ad-RFP recubiertos de sílice y libres con diluciones variables de anticuerpos neutralizantes. La intensidad de fluorescencia de RFP se midió dos días después de la transducción con configuraciones normalizadas al nivel MOI 500. La transducción con adenovirus libres se suprimió significativamente en presencia de anticuerpos neutralizantes en los dos títulos de anticuerpos ejemplares probados. Los adenovirus con nanorrecubrimiento de sílice ejemplares mostraron poco impacto diferencial a partir de la incubación con anticuerpos neutralizantes, con solo una modesta supresión en el título de anticuerpos más alto.

Se realizaron implementaciones ejemplares para demostrar la capacidad de redirigir los adenovirus mediante el uso de ligandos de direccionamiento conjugados a la superficie del recubrimiento nanoestructurado de sílice ejemplar. Por ejemplo, se usó Ad-RFP nanorrecubierto de sílice ejemplar y se le dio un recubrimiento secundario de PEG para eliminar la transducción. Por ejemplo, el Ad-RFP se recubrió con sílice y PEG, y se funcionalizó alternativamente con cRGD o β-mercaptanol. La intensidad de fluorescencia de RFP se midió 2 días después de la transducción con configuraciones normalizadas al nivel MOI 500. La Figura 5 muestra un gráfico de datos que muestra el redireccionamiento por cRGD de Ad-RFP nanorrecubierto de sílice. Los resultados ejemplares de las implementaciones mostraron que la funcionalización con cRGD era suficiente para rescatar el Ad-RFP recubierto con PEG/sílice de la ablación con PEG. El Ad-RFP PEG/sílice funcionalizado con β-mercaptanol no mostró recuperación en la eficiencia de transducción.

Se realizaron implementaciones ejemplares para demostrar la capacidad de activar la liberación viral mediante el uso de la exposición a ultrasonido. Por ejemplo, las estructuras de nanorrecubrimiento de sílice que encapsulaban el adenovirus (siAd-RFP) se compararon con las estructuras de nanorrecubrimiento de sílice que encapsulaban conjuntamente el adenovirus con una nanoemulsión (siAd-RFP-NE). La Figura 6 muestra gráficos de datos que representan la liberación de adenovirus activada por ultrasonido. Los siAd-RFP y siAd-RFP-NE ejemplares se

expusieron alternativamente a ultrasonido o se dejaron tal cual. El siAd-RFP-NE ejemplar mostró un aumento de 20 veces en la transducción de RFP después de la exposición al ultrasonido. El siAd-RFP ejemplar no mostró diferencias significativas en la transducción de RFP después de la exposición al ultrasonido.

Ejemplos

Algunas realizaciones ejemplares de los procedimientos y dispositivos de la presente tecnología se describen más abajo.

En un ejemplo, un procedimiento para producir un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva incluye formar una estructura intermedia mediante la unión de un material polimérico con una sustancia biológica en base a una fuerza electrostática, en la que la estructura intermedia formada incluye una pluralidad de regiones que presentan una carga superficial neta; y formar una estructura de recubrimiento de un material biocompatible directamente sobre la estructura intermedia formada para encerrar la sustancia biológica, en la que la estructura de recubrimiento preserva la actividad biológica de la sustancia biológica encerrada en la misma, lo que produce de esta manera un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

Las implementaciones del procedimiento ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. Por ejemplo, en algunas implementaciones del procedimiento, la estructura de recubrimiento puede incluir una nanopartícula que tiene un tamaño en el régimen de nanómetros, por ejemplo, tal como 1 nm a 999 nm. Por ejemplo, la sustancia biológica puede incluir un virus, bacteria, proteína, enzima, profármaco (por ejemplo, una molécula precursora del fármaco que puede convertirse en una forma más reactiva mediante algún medio físico o químico), y/o un vector de ácido nucleico, por ejemplo, tal como un vector de ADN o un vector de ARN. Por ejemplo, el material biocompatible usado para formar la estructura de recubrimiento puede incluir sílice. En algunas implementaciones del procedimiento, por ejemplo, la formación de la estructura intermedia puede incluir la reacción cruzada de la sustancia biológica con un material polimérico policatiónico para formar una superficie cargada positivamente en la pluralidad de regiones de la estructura intermedia. Por ejemplo, el material polimérico policatiónico puede incluir poli-l-lisina. En algunas implementaciones del procedimiento, por ejemplo, la formación de la estructura de recubrimiento puede incluir una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de la estructura intermedia, en la que la estructura de recubrimiento formada incluye una matriz de sílice envolvente que encapsula la sustancia biológica. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir, además, antes de formar la estructura de recubrimiento, unir un resto de direccionamiento a la estructura intermedia para permitir la liberación controlada de la sustancia biológica a partir de la estructura de recubrimiento. Por ejemplo, en algunas implementaciones, el procedimiento puede incluir, además, implementar el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva producido en un medio fluido a una sustancia objetivo; y aplicar una señal de activación externa a un área que incluye o está cerca a la sustancia objetivo para provocar que el resto de direccionamiento libere la sustancia biológica de la estructura de recubrimiento a la sustancia objetivo.

Las implementaciones del procedimiento ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir la adición de un agente sensibilizante para producir centros de cavitación activados por ultrasonido dentro de la estructura de recubrimiento, en el que la adición del agente sensibilizante se implementa antes de formar la estructura de recubrimiento. Por ejemplo, el agente sensibilizante puede incluir una nanoemulsión de fluorocarbono. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir, además, suministrar la sustancia biológica a una célula o tejido objetivo en un organismo vivo, en el que el suministro puede incluir inyectar el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva a través de la vasculatura del cuerpo, por ejemplo, en el que el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva se extravasa de la vasculatura a la célula o tejido objetivo; y aplicar energía acústica (por ejemplo, un(os) pulso(s) de ultrasonido) a un área del organismo vivo que incluye o está cerca de la célula o tejido objetivo para provocar que el agente sensibilizante rompa la estructura de recubrimiento y libere la sustancia biológica a la célula o tejido objetivo.

Las implementaciones del procedimiento ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir la adición de un fármaco farmacéutico o un agente terapéutico con la estructura intermedia a encerrar en la estructura de recubrimiento, en la que la adición del fármaco farmacéutico o el agente terapéutico se implementa antes de formar la estructura de recubrimiento. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir la adición de un constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala con el material biocompatible para formar la estructura de recubrimiento, en la que la adición del constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala proporciona un agente para potenciar la obtención de imágenes de la estructura de recubrimiento. Por ejemplo, la estructura de recubrimiento puede estabilizar la sustancia biológica encerrada en ella, lo que permite de esta manera la estabilidad térmica a temperaturas que incluyen 80 °C a -37 °C. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir liofilizar o secar por punto crítico el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva producido, en el que la estructura de recubrimiento preserva la actividad biológica de la sustancia biológica encerrada dentro del dispositivo de suministro de carga útil bioactiva liofilizado o secado por punto crítico.

Las implementaciones del procedimiento ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir funcionalizar una superficie exterior de la estructura de recubrimiento. Por ejemplo, en algunas implementaciones, la funcionalización puede incluir la adición de polietilenglicol (PEG) para proporcionar un recubrimiento secundario capaz de prevenir una respuesta del sistema inmunitario dentro de un organismo vivo en el que se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva. Por ejemplo, en algunas implementaciones, la funcionalización puede incluir unir un ligando de direccionamiento capaz de unirse selectivamente a una región particular de una célula o tejido de un organismo vivo en el que se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva. Por ejemplo, en algunas implementaciones, la funcionalización puede incluir unir un resto de monitoreo ambiental a la superficie externa, donde el resto de monitoreo ambiental es capaz de cambiar químicamente la forma en base a al menos una de reacción redox, reacción hipóxica o pH ácido en un entorno local en el que se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

En un ejemplo, un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva incluye una estructura de material interior que incluye un material polimérico y una sustancia biológica que están unidas entre sí a través de una interacción electrostática, en la que la estructura de material interior incluye una pluralidad de regiones que presentan una carga superficial neta, y una nanoestructura exterior formada por un material biocompatible para encapsular el material estructurado interior, lo que preserva por lo tanto la actividad biológica de la sustancia biológica encapsulada.

Las implementaciones del dispositivo ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. Por ejemplo, la nanoestructura exterior del dispositivo puede proteger la sustancia biológica de la degradación por factores ambientales externos, por ejemplo, lo que incluye pH, temperatura, presión y sustancias químicas, en un ambiente donde el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva puede implementarse. Por ejemplo, la superficie exterior de la nanoestructura exterior del dispositivo puede funcionalizarse con un ligando dirigido al tumor para provocar que el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva se acumule selectivamente en una región tumoral particular por sobre otros tejidos. Por ejemplo, la superficie exterior de la nanoestructura exterior del dispositivo puede funcionalizarse con un agente para aumentar el tiempo de circulación al reducir la captación por los tejidos, órganos y sistemas del cuerpo no deseados, por ejemplo, en el que el agente incluye polietilenglicol, un compuesto zwitteriónico, y/o un recubrimiento específico para el paciente, tales como membranas celulares. Por ejemplo, la sustancia biológica puede incluir un virus, bacteria, proteína, enzima, profármaco o vector de ácido nucleico (por ejemplo, tal como un vector de ADN o un vector de ARN). Por ejemplo, el material biocompatible puede incluir sílice.

Las implementaciones del dispositivo ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el dispositivo puede incluir, además, un agente sensibilizante acústico acoplado a la estructura de material interior para producir centros de cavitación activados por ultrasonido dentro de la nanoestructura exterior. Por ejemplo, el agente sensibilizante acústico puede incluir una nanoemulsión de fluorocarbono. Por ejemplo, cuando el dispositivo se implementa en un organismo vivo, la nanoestructura exterior del dispositivo puede provocar la ruptura en base a un pulso acústico aplicado (por ejemplo, pulso de ultrasonido) para liberar la sustancia biológica dentro del organismo vivo.

Las implementaciones del dispositivo ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el dispositivo puede incluir, además, un recubrimiento externo formado de polietilenglicol (PEG) en la superficie exterior de la nanoestructura exterior, en la que el recubrimiento externo es capaz de prevenir una respuesta del sistema inmunitario dentro de un organismo vivo cuando el dispositivo se implementa. En algunas implementaciones, por ejemplo, el dispositivo puede incluir, además, un ligando de direccionamiento formado en la superficie exterior de la nanoestructura exterior, en la que el ligando de direccionamiento es capaz de unirse selectivamente a una región particular de una célula o tejido de un organismo vivo cuando el dispositivo se implementa. En algunas implementaciones, por ejemplo, el dispositivo puede incluir, además, un resto de monitoreo ambiental formado en la superficie exterior de la nanoestructura exterior, en el que el resto de monitoreo ambiental es capaz de cambiar químicamente la forma para liberar la sustancia biológica en base a al menos una de reacción redox, reacción hipóxica o pH ácido en un ambiente local en el que el dispositivo se implementa.

En un ejemplo, un procedimiento para encapsular una sustancia biológica incluye formar un material biocompatible sobre una estructura biológica para formar una estructura de recubrimiento que encierra la estructura biológica, donde la estructura de recubrimiento tiene un tamaño en el intervalo de nanómetros, en el que la estructura biológica preserva la actividad biológica dentro de la estructura de recubrimiento.

Las implementaciones del procedimiento ejemplar pueden incluir una o más de las siguientes características ejemplares. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir, además, formar la estructura biológica que comprende hacer reaccionar de forma cruzada una sustancia biológica con un material polimérico policatiónico para formar una superficie cargada positivamente en la pluralidad de regiones de la estructura biológica. Por ejemplo, la sustancia biológica puede incluir un virus, bacteria, proteína, enzima, profármaco y/o vector de ácido nucleico que incluye un ADN o un ARN. Por ejemplo, el material biocompatible puede incluir sílice. Por ejemplo, el material polimérico policatiónico puede incluir poli-l-lisina. En algunas implementaciones, por

ejemplo, la formación de la estructura de recubrimiento puede incluir una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de la estructura biológica, en la que la estructura de recubrimiento formada incluye una matriz de sílice envolvente que encapsula la estructura biológica. En algunas implementaciones, por ejemplo, el procedimiento puede incluir, además, unir un agente sensibilizante a la estructura biológica, antes de formar el material biológico sobre la estructura biológica, para producir centros de cavitación activados por ultrasonido dentro de la estructura de recubrimiento. Por ejemplo, el agente sensibilizante puede incluir una nanoemulsión de fluorocarbono.

Ejemplos adicionales

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de varias realizaciones de la presente tecnología. Pueden presentarse otras realizaciones ejemplares de la presente tecnología antes de los siguientes ejemplos enumerados, o después de los siguientes ejemplos enumerados.

En un ejemplo de la presente tecnología (ejemplo 1), un procedimiento de encapsulación de una entidad biológica incluye crear plantillas de un material biocompatible sobre una estructura biológica para formar una estructura de recubrimiento que encierra la estructura biológica, donde la estructura de recubrimiento tiene un tamaño en el intervalo de nanómetros, en que la estructura biológica recubierta preserva su actividad biológica dentro de la estructura de recubrimiento.

En otro ejemplo de la presente tecnología (ejemplo 2), un procedimiento de encapsulación de una entidad biológica incluye el uso de un material biocompatible para formar fuera de una estructura biológica de una dimensión en un intervalo de nanómetros como una estructura de recubrimiento para encerrar la estructura biológica y preservar la actividad biológica de la estructura biológica.

El ejemplo 3 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, en el que la estructura biológica incluye un virus.

El ejemplo 4 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, en el que el material biocompatible incluye sílice.

El ejemplo 5 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, el uso de un mecanismo de activación externo para liberar la estructura biológica a partir de la estructura de recubrimiento.

El ejemplo 6 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, el uso de un resto de direccionamiento incorporado en la estructura de recubrimiento para liberar la estructura biológica a partir de la estructura de recubrimiento.

El ejemplo 7 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, alterar la carga superficial en la estructura biológica, la alteración incluye la reacción cruzada de la estructura biológica con un sustrato policatiónico para formar una superficie cargada positivamente compatible con el procedimiento de creación de plantillas.

El ejemplo 8 incluye el procedimiento del ejemplo 7, en el que el sustrato policatiónico incluye poli-l-lisina.

El ejemplo 9 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, implementar una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de la estructura biológica para formar una matriz de sílice envolvente que forma la estructura de recubrimiento alrededor de la estructura biológica.

El ejemplo 10 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, la adición de un agente sensibilizante que comprende una nanoemulsión para formar centros de cavitación activados por ultrasonido en la estructura de recubrimiento, en la que la adición del agente sensibilizante se implementa antes de la creación de plantillas.

El ejemplo 11 incluye el procedimiento del ejemplo 10, en el que el agente sensibilizante incluye emulsiones de fluorocarbono.

El ejemplo 12 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, en el que la creación de plantillas incluye incluir uno o más de un fármaco o un agente terapéutico con la estructura biológica a encerrar en la estructura de recubrimiento.

El ejemplo 13 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, en el que la creación de plantillas incluye la adición de un constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala con el material biocompatible para formar la estructura de recubrimiento, donde el constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala proporciona un agente para potenciar la obtención de imágenes de la estructura de recubrimiento.

El ejemplo 14 incluye el procedimiento del ejemplo 1 o 2, que incluye, además, funcionalizar la superficie de la estructura de recubrimiento.

El ejemplo 15 incluye el procedimiento del ejemplo 14, en el que la funcionalización incluye la adición de polietilenglicol (PEG) mediante el uso de la química de silano.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva, que comprende:
formar una estructura intermedia mediante la unión de un material polimérico que exhibe una primera carga eléctrica a un virus o vector viral que exhibe una segunda carga eléctrica diferente a la primera carga eléctrica en base a una fuerza electrostática, en el que la estructura intermedia formada incluye una pluralidad de regiones que presentan una carga superficial neta; y
formar una estructura de recubrimiento de un material biocompatible directamente sobre la estructura intermedia formada para encapsular el virus o el vector viral,
en el que la estructura de recubrimiento preserva la actividad biológica del virus o vector viral encapsulado en la misma, lo que produce de esta manera un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva,
en el que la formación de la estructura intermedia incluye hacer reaccionar el virus o vector viral con un material polimérico policatiónico para formar una superficie cargada positivamente en la pluralidad de regiones de la estructura intermedia, y en el que formar la estructura de recubrimiento incluye una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de la estructura intermedia, en la que la estructura de recubrimiento formada incluye una matriz envolvente de gel de sílice que encapsula el virus o vector viral.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la estructura de recubrimiento incluye una nanopartícula con tamaño en un régimen de nanómetros.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la formación de la estructura intermedia incluye unir el material polimérico al virus o vector viral y a una sustancia biológica adicional que incluye al menos una de una bacteria, proteína, enzima, profármaco o vector de ácido nucleico que incluye un ADN o un ARN.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material biocompatible incluye óxido de titanio o fosfato de calcio.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
añadir un agente sensibilizante para producir centros de cavitación activados por ultrasonido dentro de la estructura de recubrimiento,
en el que la adición del agente sensibilizante se implementa antes de formar la estructura de recubrimiento.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
añadir un fármaco farmacéutico o un agente terapéutico con la estructura intermedia a encapsular en la estructura de recubrimiento,
en el que la adición del fármaco farmacéutico o el agente terapéutico se implementa antes de formar la estructura de recubrimiento.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
añadir un constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala con el material biocompatible para formar la estructura de recubrimiento,
en el que el constituyente de óxido de hierro u otro material a nanoescala añadido proporciona un agente para mejorar la obtención de imágenes de la estructura de recubrimiento.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
liofilizar o secar por punto crítico el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva producido,
en el que la estructura de recubrimiento preserva la actividad biológica del virus o vector viral encapsulado dentro del dispositivo de suministro de carga útil bioactiva liofilizado o secado por punto crítico.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
antes de formar la estructura de recubrimiento, unir un resto de direccionamiento a la estructura intermedia para permitir la liberación controlada del virus o vector viral a partir de la estructura de recubrimiento.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
funcionalizar una superficie exterior de la estructura de recubrimiento mediante la adición de polietilenglicol (PEG) para proporcionar un recubrimiento secundario capaz de prevenir una respuesta del sistema inmunitario dentro de un organismo vivo en el que se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

11. Un dispositivo de suministro de carga útil bioactiva, que comprende:
una estructura de material interior que incluye un material polimérico y una sustancia biológica, en el que la estructura biológica es un virus o vector viral, que están unidos entre sí a través de una interacción electrostática, en el que la estructura del material interior incluye una pluralidad de regiones que presentan una carga superficial neta;
una nanoestructura exterior formada por un material biocompatible para encapsular el material estructurado interior, lo que preserva de esta forma la actividad biológica del virus o vector viral encapsulado;

en el que la estructura intermedia que incluye una superficie cargada positivamente en la pluralidad de regiones de la estructura intermedia se forma a través de una reacción del virus o vector viral con un material polimérico policatiónico, y en el que la nanoestructura exterior incluye una matriz de gel de sílice que encapsula el virus o vector viral formada por una reacción de condensación sol-gel de sílice mediada por carga directamente sobre la superficie de la estructura intermedia.

12. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que la nanoestructura exterior protege al virus o vector viral de la degradación de factores ambientales externos, lo que incluye pH, temperatura, presión y sustancias químicas en un ambiente donde se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

13. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que una superficie externa de la nanoestructura exterior se funcionaliza con un ligando de direccionamiento para provocar que el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva se acumule selectivamente en una región en particular por sobre otros tejidos.

14. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que una superficie exterior de la nanoestructura exterior se funcionaliza con un ligando dirigido al tumor para provocar que el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva se acumule selectivamente en una región tumoral por sobre otros tejidos.

15. El dispositivo de la reivindicación 11, en el que una superficie exterior de la nanoestructura exterior se funcionaliza con un agente para aumentar el tiempo de circulación al reducir la captación desde los tejidos corporales, órganos y sistemas no deseados, el agente incluye al menos uno de polietilenglicol, un compuesto zwitteriónico, o un recubrimiento específico para el paciente, tales como membranas celulares.

16. El dispositivo de la reivindicación 11, que comprende además:
un recubrimiento externo formado de polietilenglicol (PEG) en una superficie externa de la nanoestructura exterior, donde el recubrimiento externo es capaz de prevenir una respuesta del sistema inmunitario dentro de un organismo vivo cuando se implementa el dispositivo de suministro de carga útil bioactiva.

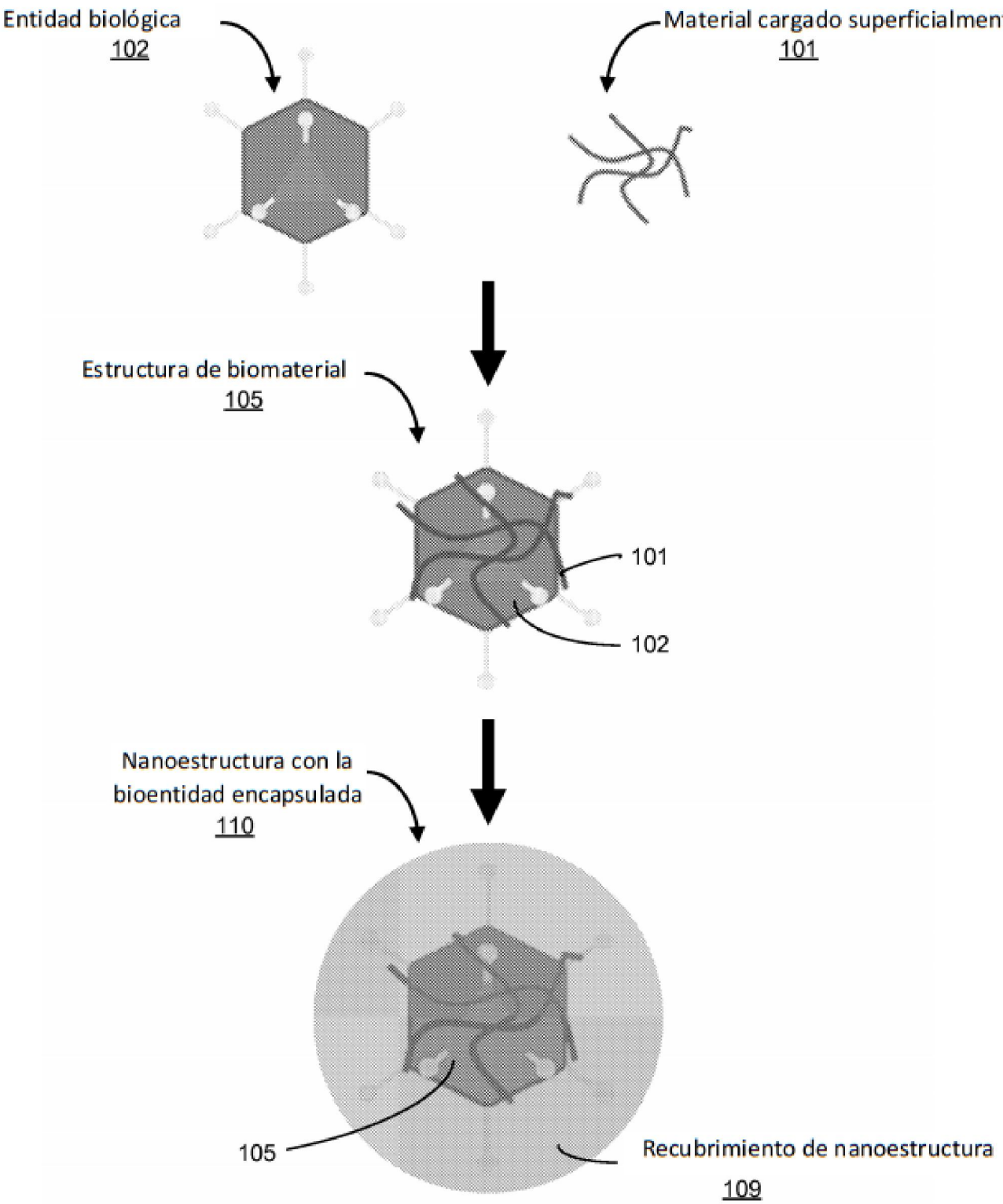
Entidad biológica
102
Material cargado superficialmente
101
Estructura de biomaterial
105
101
102
Nanoestructura con la
bioentidad encapsulada
110
105
Recubrimiento de nanoestructura
109

Figura 1A

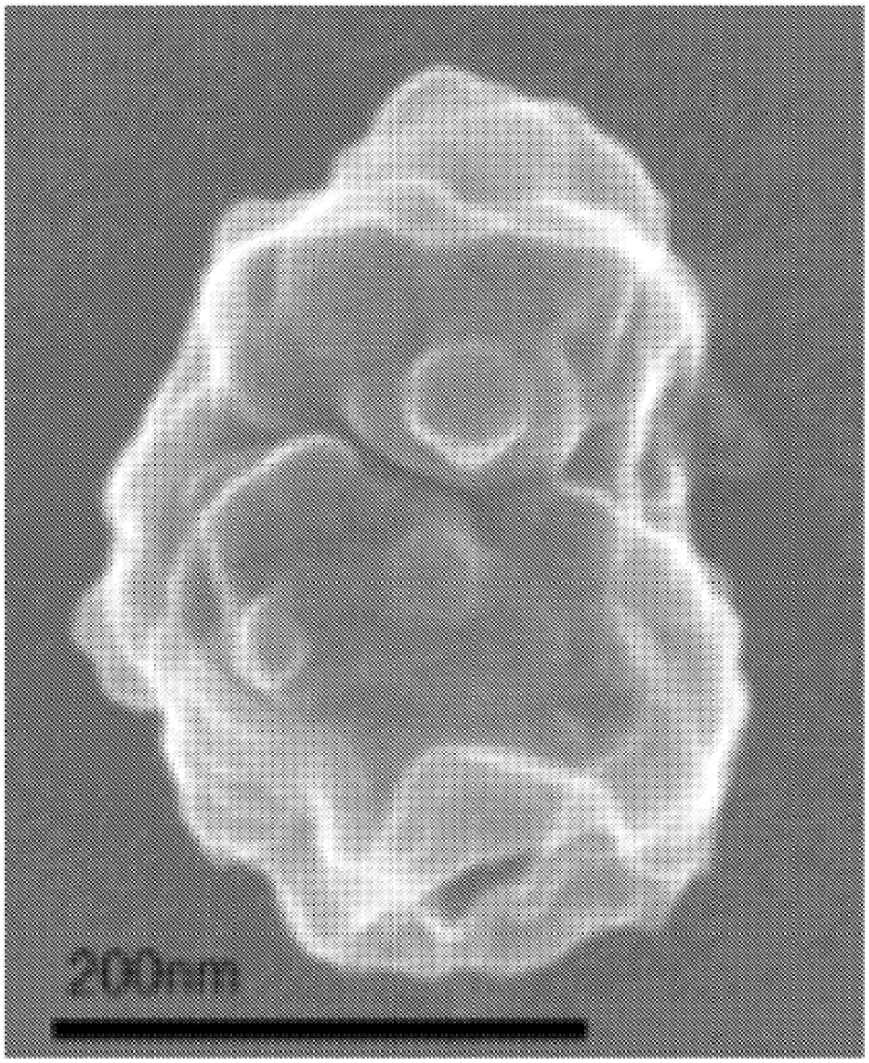

Figura 1B

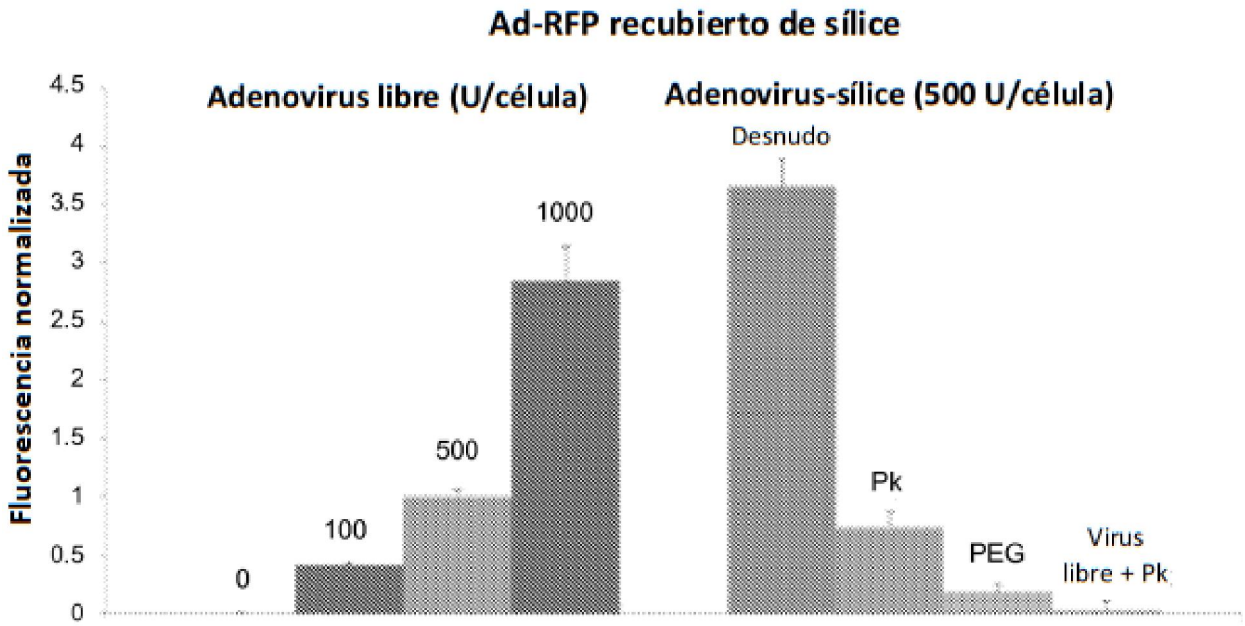

Figura 2A

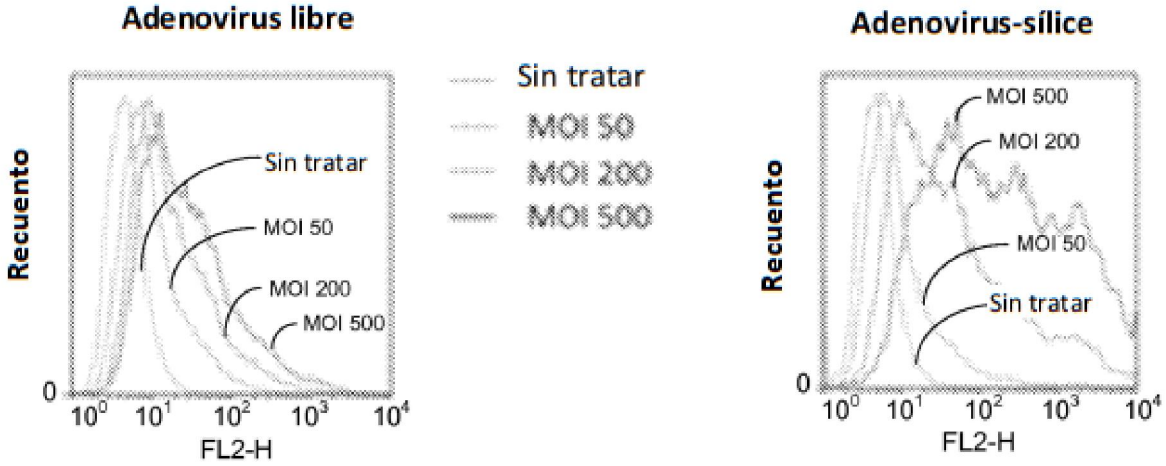

Figura 2B

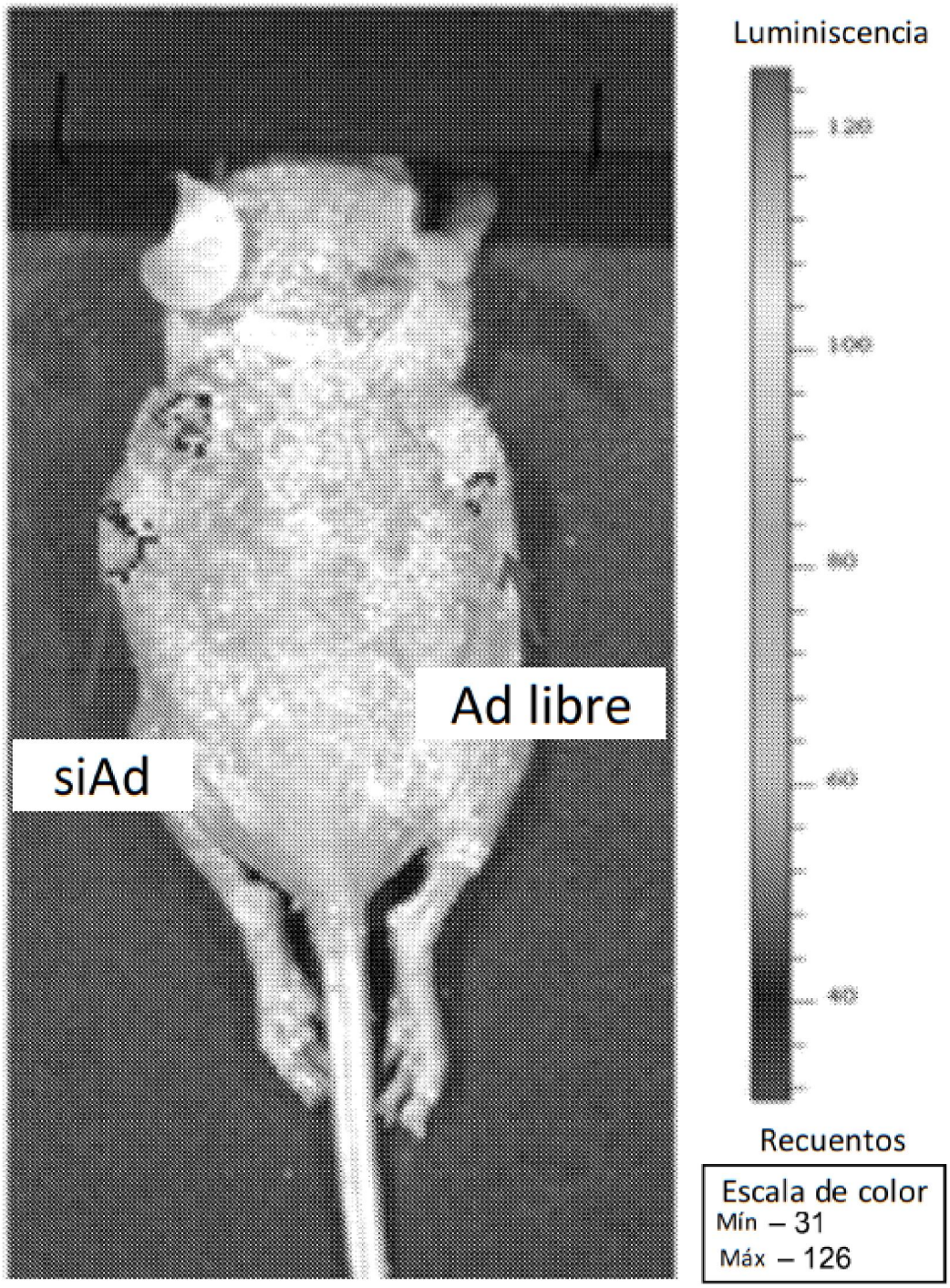
siAd
Ad libre
Luminiscencia
Recuentos
Escala de color
Mín – 31
Máx – 126

Figura 2C

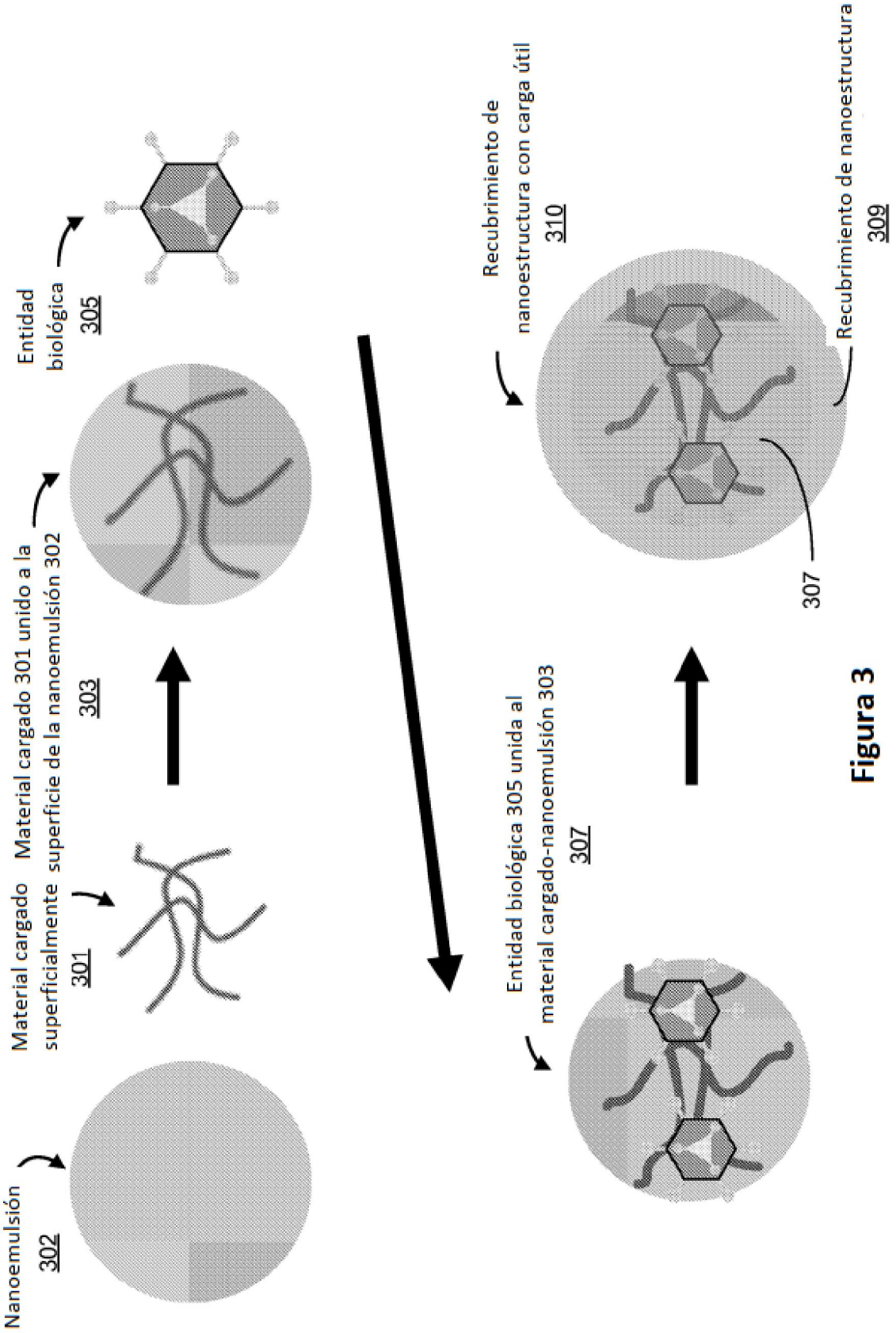
Nanoemulsión
302
Material cargado superficialmente
301
Material cargado 301 unido a la superficie de la nanoemulsión 302
303
Entidad biológica
305
Entidad biológica 305 unida al material cargado-nanoemulsión 303
307
Recubrimiento de nanoestructura con carga útil
310
307
Recubrimiento de nanoestructura
309

Figura 3

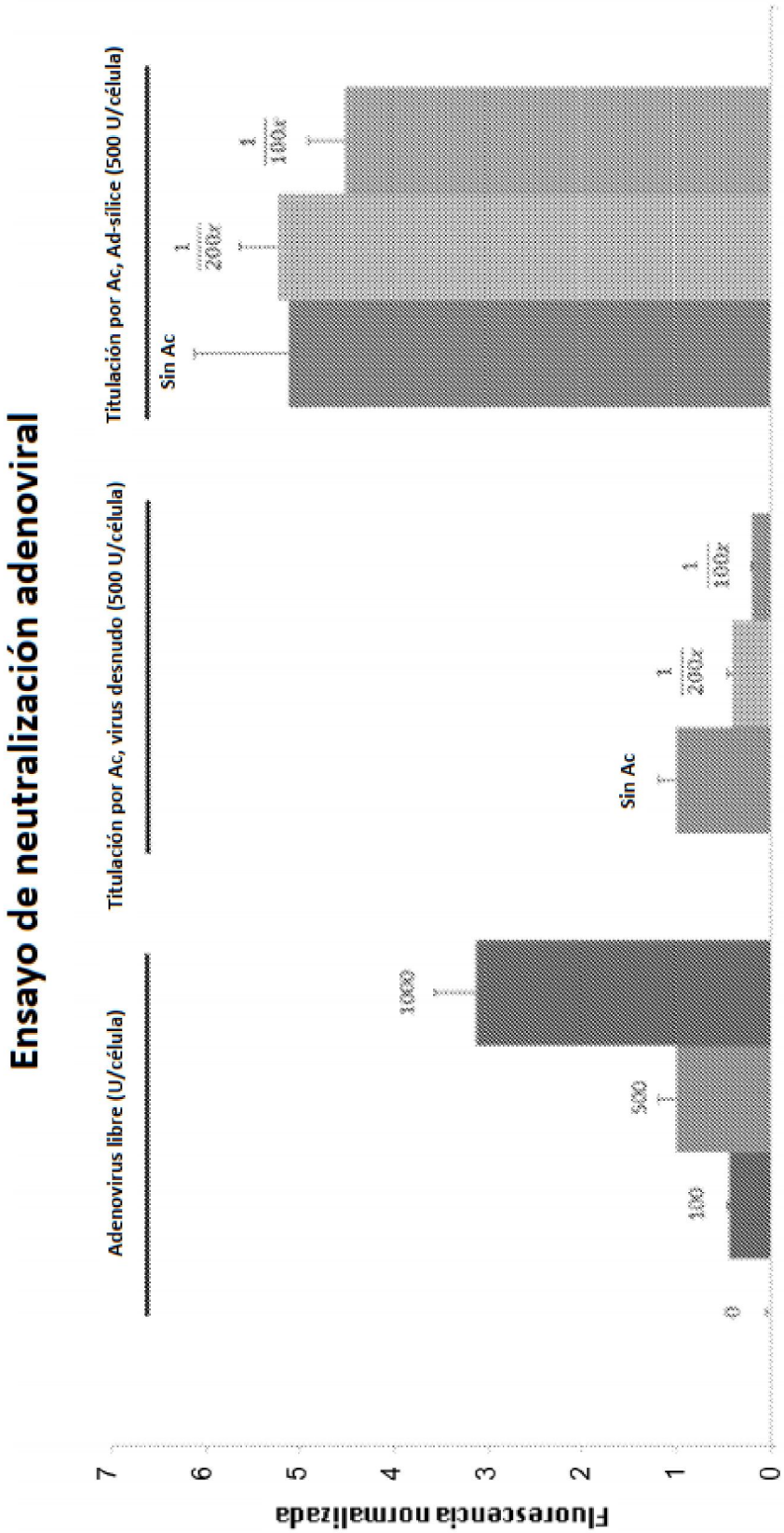
Ensayo de neutralización adenoviral
Fluorescencia normalizada
0
1
2
3
4
5
6
7
Adenovirus libre (U/célula)
0
100
500
1000
Titulación por Ac, virus desnudo (500 U/célula)
Sin Ac
1
1/200
1/100
Titulación por Ac, Ad-sílice (500 U/célula)
Sin Ac
1
1/200
1/100

Figura 4

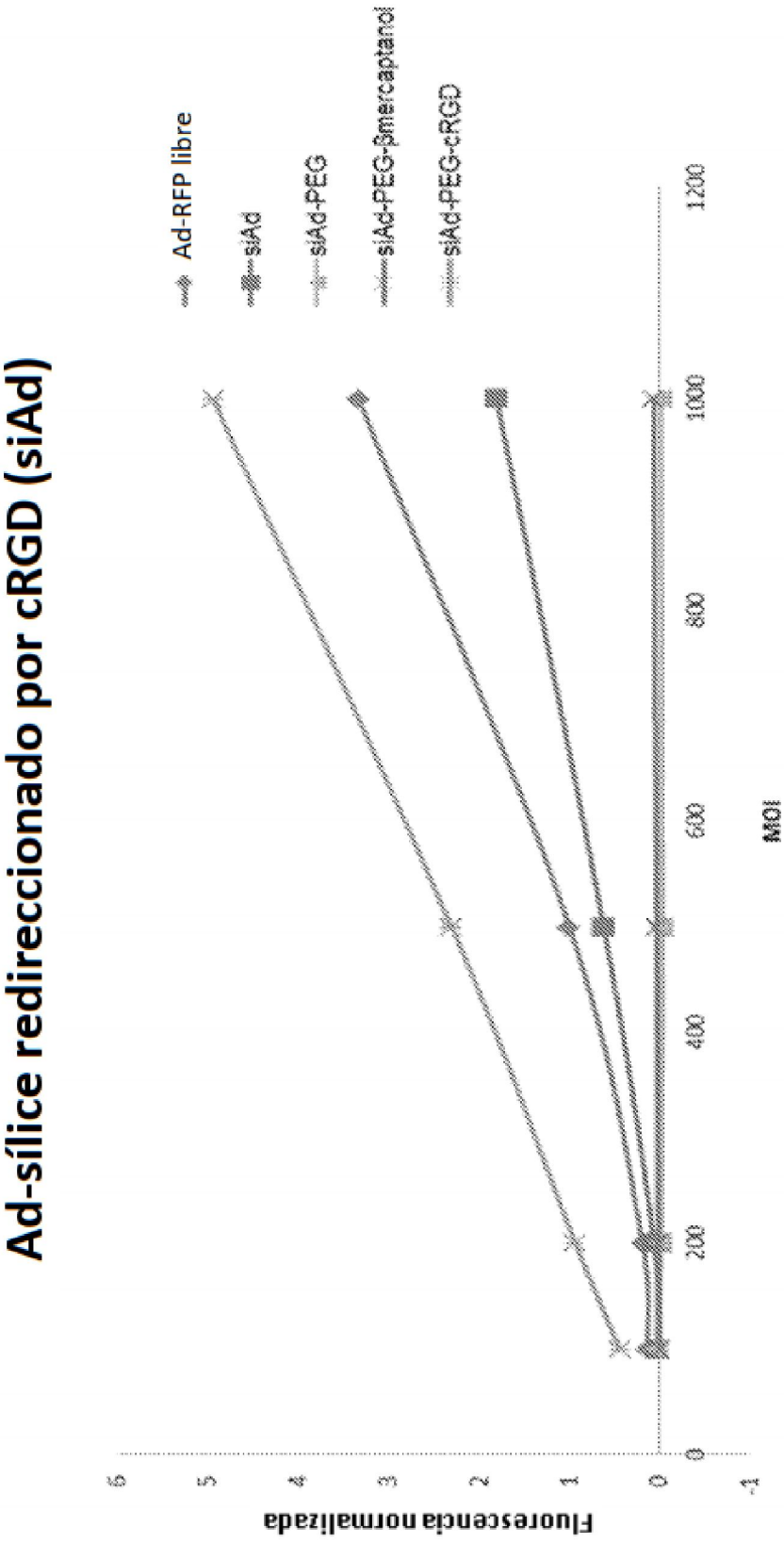
Ad-sílice redireccionado por cRGD (siAd)
Ad-RFP libre
siAd
siAd-PEG
siAd-PEG-βmercaptanol
siAd-PEG-cRGD
Fluorescencia normalizada
MOI
-1
0
1
2
3
4
5
6
0
200
400
600
800
1000
1200

Figura 5

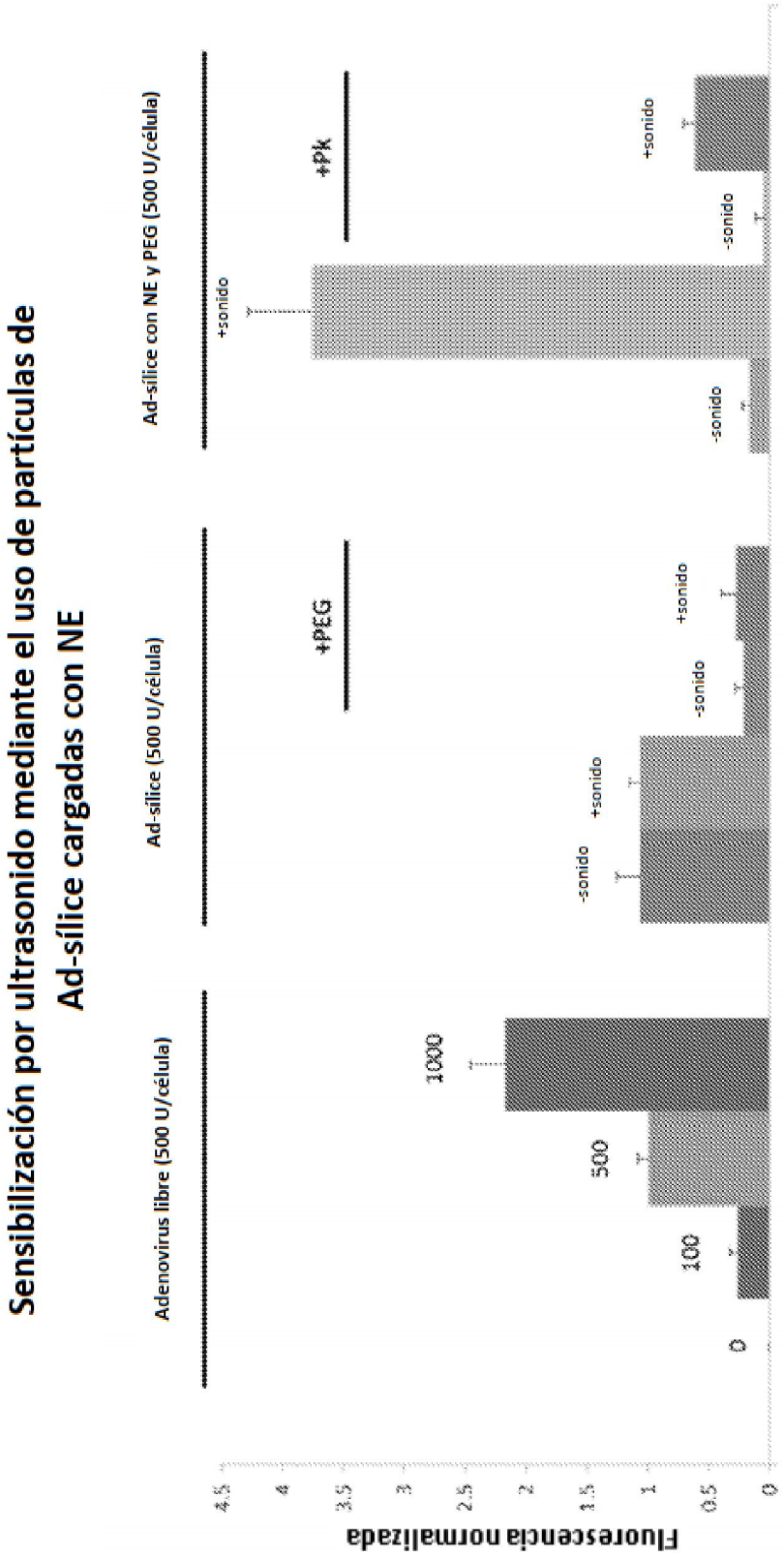
Sensibilización por ultrasonido mediante el uso de partículas de Ad-sílice cargadas con NE
Adenovirus libre (500 U/célula)
Ad-sílice (500 U/célula)
Ad-sílice con NE y PEG (500 U/célula)
+PEG
+Pk
-sonido
+sonido
0
100
500
1000
Fluorescencia normalizada
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0

Figura 6