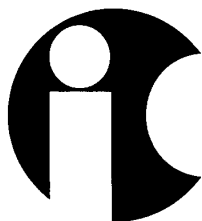


No. 12-116675-00000-0000

Fecha: 2012-07-11 16:25:16 Dep: 2020 DIR.NUEVASOR  
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act: 411 PRESENTACION Folios: 154

Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

54. TÍTULO Magnetización de campo  
Uniforme y Selección de -  
Formulaciones Terapéuticas

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL \_\_\_\_\_

71. SOLICITANTE The children Hospital  
The Trustees of the UniversityDOMICILIO Philadelphia EEUU74. APODERADO Juan Carlos Uribe22. BOGOTÁ, D.C., Julio 11/2012



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



**No. 12-116675- -00000-0000**

Fecha 2012-07-11 16:25:16 Dep. 2020 DIR NUEVASCR  
Act. 11 PATENTE Y M. E. 378 FASE NACIONAL I  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 154

Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

|                                                                                                               |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                             | TIPO DE SOLICITUD                                                                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención<br><input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I | <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad<br><input type="checkbox"/> Capítulo II |
| 2                                                                                                             | DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)                                                                                                        |                                                                                                            |                                                                                                |
| Solicitud Internacional No.                                                                                   |                                                                                                                                               | PCT/ US2010/056674                                                                                         | Fecha 15/11/2010                                                                               |
| Publicación Internacional No.                                                                                 |                                                                                                                                               | WO 2011/07552 A1                                                                                           | Fecha 23/06/2011                                                                               |
| 3                                                                                                             | TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)                                                                                    |                                                                                                            |                                                                                                |
| MAGNETIZACION DE CAMPO UNIFORME Y SELECCION DE FORMULACIONES TERAPEUTICAS                                     |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 4                                                                                                             | CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)                                                                                                             |                                                                                                            |                                                                                                |
| A61K 39/395 (2006.01)                                                                                         |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 5                                                                                                             | SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL                                                                                      |                                                                                                                                               | NOMBRE                                                                                                     | IDENTIFICACIÓN TIPO                                                                            |
| THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA                                                                       |                                                                                                                                               | VER ANEXO                                                                                                  |                                                                                                |
| 6                                                                                                             | DATOS DEL SOLICITANTE                                                                                                                         |                                                                                                            |                                                                                                |
| DIRECCIÓN 1) 34TH AND CIVIC CENTER BOULEVARD PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19104                                 |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO                                                                                               |                                                                                                |
| CIUDAD PHILADELPHIA                                                                                           |                                                                                                                                               | CORREO ELECTRÓNICO                                                                                         |                                                                                                |
| DEPARTAMENTO/ESTADO                                                                                           |                                                                                                                                               | NACIONALIDAD O                                                                                             |                                                                                                |
| PAÍS DE RESIDENCIA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                  |                                                                                                                                               | LUGAR DE CONSTITUCIÓN ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                            |                                                                                                |
| 7                                                                                                             | INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria                                                              |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS                                                                                                     |                                                                                                                                               | NOMBRES                                                                                                    | NACIONALIDAD                                                                                   |
| 1. J. LEVY                                                                                                    |                                                                                                                                               | ROBERT                                                                                                     | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                      |
| 2. CHORNY                                                                                                     |                                                                                                                                               | MICHAEL                                                                                                    | ISRAEL                                                                                         |
| 3. MUZYKANTOV                                                                                                 |                                                                                                                                               | VLADIMIR                                                                                                   | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                      |
| 4. HOOD                                                                                                       |                                                                                                                                               | ELIZABETH                                                                                                  | ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                      |
| 5.                                                                                                            |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:                                                                              |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 8                                                                                                             | DATOS INVENTOR (ES)                                                                                                                           |                                                                                                            |                                                                                                |
| PAÍS RESIDENCIA                                                                                               | DEPARTAMENTO/ESTADO                                                                                                                           | CIUDAD                                                                                                     | DIRECCIÓN                                                                                      |
| 1. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                                  | PENNSYLVANIA                                                                                                                                  | MERION STATION                                                                                             | 440 MERION ROAD MERION STATION, PA 19066 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                             |
| 2. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                                  | PENNSYLVANIA                                                                                                                                  | HUNTINGDON VALLEY                                                                                          | 400 CARSON TERRACE HUNTINGDON VALLEY, PA 19006, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                      |
| 3. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                                  | PENNSYLVANIA                                                                                                                                  | WARWICK                                                                                                    | 101 WHITE PINE COURT WARWICK, PA 18974 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                               |
| 4. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                                  | PENNSYLVANIA                                                                                                                                  | PHILADELPHIA                                                                                               | 1141 TITAN STREET PHILADELPHIA, PA 19147 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                             |
| 5.                                                                                                            |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)                                                             |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| <input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación. |                                                                                                                                               |                                                                                                            |                                                                                                |
| 9                                                                                                             | <input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO                                                    |                                                                                                            |                                                                                                |
| APELLIDOS                                                                                                     |                                                                                                                                               | NOMBRES                                                                                                    | IDENTIFICACIÓN                                                                                 |
| URIBE RESTREPO                                                                                                |                                                                                                                                               | JUAN CARLOS                                                                                                | C.C. 79.159.313 T.P. 54.493                                                                    |
| DIRECCIÓN CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o. BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA                                                |                                                                                                                                               | No. TELÉFONO 6019660                                                                                       |                                                                                                |
| CIUDAD BOGOTÁ, D.C. COLOMBIA                                                                                  |                                                                                                                                               | CORREO ELECTRÓNICO tum@tumnet.com                                                                          |                                                                                                |
| PAÍS COLOMBIA                                                                                                 |                                                                                                                                               | No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL                                                               |                                                                                                |

2

11

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------------|
| 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIONES DE PRIORIDAD                                                                               |                                                                                                                                                            |             | <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO |
| (33) PAÍS DE ORIGEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                          | CÓDIGO PAÍS                                                                                                                                                | (31) NÚMERO | (32) FECHA (AAAA/MM/DD)                                            |
| 1. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                          | US                                                                                                                                                         | 12/653,465  | 15 DE DICIEMBRE DE 2009                                            |
| 2.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 3.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS                                                 |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.                                                                                                                                                                       |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                      |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES                                                     |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.                                                                                                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | REDUCCIÓN DE TASAS                                                                                       |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.                                                                                                                                          |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Micro, pequeñas y medianas empresas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Universidades públicas o privadas <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Entidades sin ánimo de lucro <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet. |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO                                                                   | N°                                                                                                                                                         | Fecha       |                                                                    |
| 16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL                                           |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| <div><div>7</div><div></div></div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ANEXOS                                                                                                   |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| Documentación Técnica                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          | Documentación Jurídica                                                                                                                                     |             |                                                                    |
| Solicitud Internacional en castellano                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          |                                                                                                                                                            |             |                                                                    |
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> Descripción N° de folios:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                          | 9. <input type="checkbox"/> Poderes, si fuera el caso.                                                                                                     |             |                                                                    |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 26                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | 10. <input type="checkbox"/> Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.                                        |             |                                                                    |
| 3. <input checked="" type="checkbox"/> Dibujos y/o figuras N° folios:                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                          | 11. <input type="checkbox"/> Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. |             |                                                                    |
| 4. <input checked="" type="checkbox"/> Resumen.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | 12. <input type="checkbox"/> Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.       |             |                                                                    |
| 5. <input type="checkbox"/> Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                          | 13. Reducción de tasas                                                                                                                                     |             |                                                                    |
| 6. <input type="checkbox"/> Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                          | Micro, pequeñas o medianas empresas                                                                                                                        |             |                                                                    |
| 7. <input type="checkbox"/> Arte final 12 x 12.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.                |             |                                                                    |
| 8. <input type="checkbox"/> Anexo formato digital.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.                                                 |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | Universidades públicas o privadas                                                                                                                          |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación                                                 |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | Entidades sin ánimo de lucro                                                                                                                               |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Copia de registro vigente en Cámara de comercio.                                                                                  |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Hoja de información complementaria.                                                                                               |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | <input type="checkbox"/> Otros, especificar                                                                                                                |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | 14. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.                                                    |             |                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                          | 15. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.                                                                          |             |                                                                    |

|  |                                                                                                                                                                                                                                   |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>16. <input type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.</p> <p>17. <input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.</p> |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT



|                                                          |                                                             |                      |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1                                                        | (12) <b>Industria y Comercio</b><br><b>SUPERINTENDENCIA</b> | NUMERO DE RADICACIÓN |
| <input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención |                                                             |                      |

|                                                                                           |                                 |                                     |                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad                                    |                                 | FECHA DE PRESENTACIÓN               |                                                                                                         |
| 4                                                                                         | (71) SOLICITANTE (S)            |                                     |                                                                                                         |
| APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL<br>2. THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA<br>3.<br>4. |                                 | NOMBRE                              | IDENTIFICACIÓN<br>TIPO                                                                                  |
| 5                                                                                         | DATOS DEL SOLICITANTE           |                                     |                                                                                                         |
| PAÍS DE RESIDENCIA<br>2. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA<br>3.<br>4.                            |                                 | DEPARTAMENTO/ESTADO<br>PENNSYLVANIA | CIUDAD<br>PHILADELPHIA<br>DIRECCIÓN<br>3180 CHESTNUT STREET, SUITE 200 PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA 19104 |
| TELÉFONO<br>2.<br>3.<br>4.                                                                |                                 | FAX                                 | E-MAIL<br>NACIONALIDAD                                                                                  |
| 6                                                                                         | (72) INVENTOR (ES)              |                                     |                                                                                                         |
| APELLIDOS<br>6.<br>7.<br>8.<br>9.<br>10.<br>11.<br>12.                                    |                                 | NOMBRE                              | NACIONALIDAD                                                                                            |
| 7                                                                                         | DATOS INVENTOR (ES)             |                                     |                                                                                                         |
| DIRECCIÓN<br>6.<br>7.<br>8.<br>9.<br>10.<br>11.<br>12.                                    |                                 | CIUDAD                              | DEPARTAMENTO/ESTADO<br>PAÍS RESIDENCIA                                                                  |
| 9                                                                                         | (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD |                                     |                                                                                                         |
| PAÍS DE ORIGEN<br>4.<br>5.<br>6.<br>7.<br>8.<br>9.<br>10.                                 |                                 | CÓDIGO PAÍS                         | NÚMERO<br>FECHA (AAAA/MM/DD)                                                                            |

|                                                                                                                                          |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|
| SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO<br>NIT : 800.176.089-2<br>- / -                                                                 |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| Industria y Comercio<br>SUPERINTENDENCIA                                                                                                 | RECIBO DE CAJA                                               |           |                                                                                      | No. 12 - 0069927                         |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           |                                                                                      | Bogotá D.C., Julio 10 de 2012 - 16:05:11 |              |
| RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA                                                                                              |                                                              |           |                                                                                      | NI 830.001.432                           |              |
| *** Soporte del Pago ***                                                                                                                 |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| TIPO PAGO                                                                                                                                | BANCO                                                        | CUENTA    | No. PAGO                                                                             | FECHA PAGO                               | VR. PAGO     |
| CONSIGNACION                                                                                                                             | BANCO DE BOGOTA                                              | 062754387 | 325041990                                                                            | 10/07/2012                               | 1.730.000.00 |
| *** Conceptos Pagados ***                                                                                                                |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| CANT. RENTISTICO                                                                                                                         | CONCEPTO                                                     |           |                                                                                      | Vr. UNIDITARIO                           | Vr. CONCEPTO |
| 16 50005-01-01 SOLICITUDES                                                                                                               | 1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL<br>A LAS 10 INICIALES |           |                                                                                      | 30.000.00                                | 480.000.00   |
|                                                                                                                                          |                                                              |           |                                                                                      |                                          | \$480.000.00 |
| SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***                                                                               |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| Responsable: _____                                                                                                                       |                                                              |           | SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO                                             |                                          |              |
| Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____                                                                                          |                                                              |           |  |                                          |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           | No. 12-116675- -00000-0000                                                           |                                          |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           | Fecha 2012-07-11 16:25:16 Dep. 2020 DIR NUEVASCR                                     |                                          |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           | Tra. 11 PATENTE/III Eve 378 FASENACIONAL I                                           |                                          |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           | Act. 411 PRESENTACION Folios: 154                                                    |                                          |              |
|                                                                                                                                          |                                                              |           | Act. 411 PRESENTACION Folios: 163                                                    |                                          |              |
| Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia                                                              |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |
| Julio 10 de 2012 - 16:05:11                                                                                                              |                                                              |           |                                                                                      |                                          |              |

Marzo 26 de 2012 - 15:44:11



- (51) International Patent Classification:  
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2010/056674
- (22) International Filing Date:  
15 November 2010 (15.11.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
12/653,465 15 December 2009 (15.12.2009) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA [US/US]; 3501 Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104 (US). THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US]; 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): LEVY, Robert, J. [US/US]; 440 Merion Road, Merion Station, PA 19066 (US). CHORNY, Michael [IL/US]; 400 Carson Terrace, Huntingdon Valley, PA 19006 (US). MUZYKANTOV, Vladimir [US/US]; 101 White Pine Court, Warwick, PA 18974 (US). HOOD, Elizabeth [US/US]; 1141 Titan Street, Philadelphia, PA 19147 (US).
- (74) Agent: ROTHE, Christopher A.; Patnerprestia, P.o. Box 980, Valley Forge, PA 19482 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AF, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: UNIFORM FIELD MAGNETIZATION AND TARGETING OF THERAPEUTIC FORMULATIONS

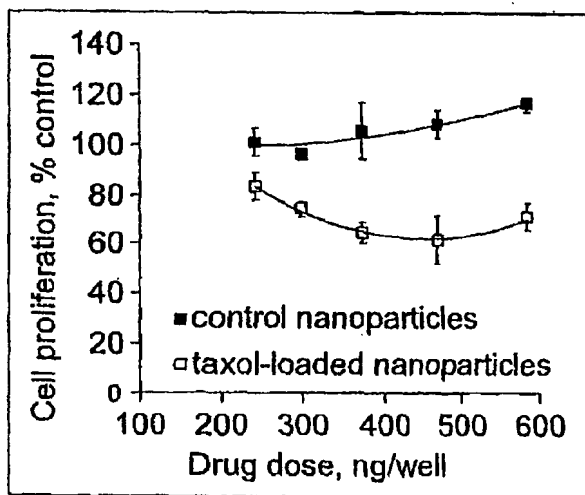


Fig. 2

(57) Abstract: Systems and methods for magnetic targeting of therapeutic particles are provided. Therapeutic particles comprise one or more magnetic or magnetizable materials and at least one therapeutic agent. Therapeutic particles are specifically targeted using uniform magnetic fields capable of magnetizing magnetizable materials, and can be targeted to particular locations in the body, or can be targeted for capture, containment, and removal. Therapeutic particles can comprise antioxidant enzymes, and can be targeted to cells to protect the cells from oxidative damage.

## MAGNETIZACION DE CAMPO UNIFORME Y SELECCION DE FORMULACIONES TERAPEUTICAS

### Campo de la Invención

Esta invención se refiere en general al campo de la bioterapia. Más específicamente, la invención se refiere al uso de campos magnéticos uniformes para inducir la magnetización de objetivos magnetizables y generar gradientes de campo magnético. Los gradientes resultantes pueden utilizarse para la selección magnética de agentes terapéuticos en nanopartículas magnetizadas o magnetizables dentro del cuerpo de un sujeto.

### Antecedentes de la Invención

Varias publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas y artículos escolares, se citan en toda la descripción. Cada una de estas publicaciones se incorpora por referencia en la presente, en su totalidad.

Los agentes terapéuticos suministrados en una forma convencional nanoespecífica por lo general se distribuyen en áreas no designadas del cuerpo. Como una consecuencia, el agente puede metabolizarse, por ejemplo, a través de un metabolismo de un primer paso del hígado, por lo tanto resultando en una biodisponibilidad disminuida y la posibilidad de dosis aumentadas a un costo mayor y con el

dar como resultado efectos adversos y respuestas farmacológicas indeseadas en el sujeto al cual se administra. Como resultado, ciertos agentes pueden contraindicarse en ciertos sujetos o bajo ciertas condiciones.

El implante de dispositivos médicos dentro de un sujeto puede necesitar una quimioterapia de seguimiento, por ejemplo, para disminuir la posibilidad de infección, para reducir la inflamación, para reparar el tejido, o para evitar un daño tisular local adicional. Los dispositivos de elusión de fármacos incluyendo endoprótesis, y el uso en aumento de una variedad de aplicadores biomédicos para efectuar el suministro seleccionado de los fármacos al área del implante. Los implantes que contienen fármacos están limitados, sin embargo, hasta ahora ya que generalmente contienen solamente una pequeña dosis de un solo agente terapéutico, y por lo tanto carecen de la posibilidad de la re-administración del mismo o diferente agente terapéutico a través del dispositivo implantado.

Las nanopartículas y las micropartículas han demostrado potencial como sistemas portadores para la variedad de agentes terapéuticos, incluyendo enzimas para la terapia de reemplazo de enzimas, hormonas, y agentes modificadores de células, y material genético también, así como formación de imágenes. Los intentos iniciales para utilizar nanopartículas y micropartículas para el suministro

interiores de los agentes terapéuticos.

La explicación anterior indica que los sistemas portadores muestran ser prometedores para optimizar la administración del agente, y como un vehículo posible para el suministro de fármacos seleccionados. Tal tecnología está limitada, sin embargo, en su capacidad para actualmente efectuar la distribución seleccionada optimizada. A este respecto, una selección de magneto se considera como una forma atractiva para obtener el suministro seleccionado optimizado de agentes, particularmente aquellos formulados como portadores de nanopartículas. Los intentos preliminares para suministrar agentes terapéuticos magnetizados o portadores magnéticos que contienen el agente a ubicaciones específicas en el cuerpo han demostrado ser prometedores, ver la Patente de E. U. A. No. 5,921,244. Estas metodologías, sin embargo, sufren de un inconveniente mayor, principalmente que este método está restringido a objetivos que están cerca de la superficie del cuerpo.

De esta forma, existe la necesidad de la selección optimizada y eficaz utilizando portadores magnéticos. Si se desea que los sistemas terapéuticos permitan la administración periférica así como local, y que el sistema terapéutico permita a los practicantes administrar dosis de agentes que disminuyen los efectos adversos en pacientes, así como permitir la administración de agentes a pacientes en

de ser capaz de eliminar los portadores magnéticos sin utilizar o consumidos que además disminuyen la posibilidad de efectos secundarios en el paciente.

### **Breve Descripción de la Invención**

La invención presenta sistemas para magnéticamente seleccionar partículas terapéuticas. En general, los sistemas comprenden una partícula que comprende por lo menos un agente terapéutico y un primer material magnético o magnetizable, un dispositivo implantable tal como una endoprótesis que comprende un segundo material magnético o magnetizable, y un sistema de recuperación que comprende un tercer material magnético o magnetizable capaz de conectarse reversiblemente con el sujeto. En algunos aspectos, los sistemas además comprenden por lo menos un generador de campo magnético configurado para generar un campo magnético uniforme capaz de magnetizar el material magnetizable. El campo magnético uniforme puede generar por lo menos un gradiente de campo magnético direccionable. En gradiente puede dirigir las partículas hacia el dispositivo así como dirigir cualquier partícula o partículas consumidas que no se suministran al dispositivo del sistema de recuperación. El gradiente de campo magnético puede generarse próximo al dispositivo y/o próximo al sistema de recuperación. El agente terapéutico puede ser cualquier agente adecuado para el propósito terapéutico para el cual se está utilizando, y puede

un ácido nucleico regulador tal como ARNsi, ARNsh, o ARNmi. En algunos aspectos altamente preferidos, el agente es una biomolécula, tal como una proteína, preferiblemente una enzima, y más preferiblemente una enzima antioxidante. En algunos aspectos altamente preferidos, el agente es una célula tal como una célula endotelial, y en particular, una célula del endotelio vascular.

La invención también representa métodos para seleccionar magnéticamente una partícula terapéutica para un dispositivo implantado tal como una endoprótesis. En general, los métodos pueden comprender administrar al sujeto que tiene un dispositivo implantado una partícula que comprende por lo menos un agente terapéutico y un primer material magnético o magnetizable, generar un campo magnético uniforme capaz de magnetizar materiales magnetizables, y opcionalmente, remover las partículas no suministradas al dispositivo implantado. En algunos aspectos, el campo magnético uniforme genera un gradiente de campo magnético próximo al dispositivo implantado que comprende un segundo material magnético o magnetizable. En algunos aspectos, el gradiente selecciona la partícula para el dispositivo implantado. Los métodos además pueden comprender remover las partículas consumidas. El agente terapéutico puede ser cualquier agente adecuado para el propósito terapéutico para el cual se está utilizando, y puede comprender un fármaco, biomolécula, o célula entre otras cosas. En algunos aspectos altamente preferidos, el

o ARNmi. En algunos aspectos altamente preferidos, el agente es una biomolécula, tal como una proteína, preferiblemente una enzima, y más preferiblemente una enzima antioxidante. En algunos aspectos altamente preferidos, el agente es una célula tal como una célula endotelial, y en particular, una célula del endotelio vascular.

En algunos aspectos de los métodos de la invención, la remoción de las partículas no suministradas al dispositivo implantado comprende reversiblemente conectar un tercer material magnético magnetizable al sujeto y generar un segundo gradiente de campo magnético próximo al tercer material magnético o magnetizable. El segundo gradiente de campo magnético puede seleccionar las partículas para el tercer material magnético o magnetizable. Es altamente preferido que el tercer material magnético o magnetizable se conecte reversiblemente con por lo menos un vaso sanguíneo del sujeto. En otros aspectos, la remoción de las partículas no suministradas al dispositivo implantado puede comprender eliminar la sangre del sujeto, poner en contacto la sangre con un tercer material magnético o magnetizable, generar un segundo gradiente de campo magnético próximo al tercer material magnético o magnetizable, y regresar la sangre al sujeto. El segundo gradiente de campo magnético puede seleccionar partículas para el tercer material magnético o magnetizable. Preferiblemente, la sangre devuelta está sustancialmente libre de partículas. y más preferiblemente

la remoción de las partículas consumidas puede comprender reversiblemente conectar un tercer material magnético o magnetizable al sujeto y generar un segundo gradiente de campo magnético próximo al tercer material magnético o magnetizable. El segundo gradiente de campo magnético selecciona las partículas consumidas para el tercer material magnético o magnetizable. En otros aspectos, la remoción de las partículas consumidas puede comprender remover la sangre del sujeto, poner el contacto la sangre con un tercer material magnético o magnetizable, generar un segundo gradiente de campo magnético próximo al tercer material magnético o magnetizable, y regresar la sangre al sujeto. El segundo gradiente de campo magnético selecciona las partículas consumidas para el tercer material magnético o magnetizable. Preferiblemente, la sangre devuelta estando sustancialmente libre de partículas consumidas.

La invención también representa métodos para preparar nanopartículas. Los métodos pueden comprender proporcionar una primera solución acuosa que comprende una sal soluble en agua de un ácido graso monocarboxílico o un monofosfato lípido, un estabilizador tal como albúmina o Pluronic F-127®, y por lo menos un agente terapéutico, y agregar a la primera solución acuosa una segunda solución acuosa que comprende un catión biocompatible polivalente tal como calcio o zinc. El agente terapéutico puede ser taxol o ácidos retinoicos todos-trans. La sal soluble en agua del

nanocristales magnéticos. La segunda solución acuosa además puede comprender por lo menos un polipéptido catiónico tal como poli-L-arginina. En algunos aspectos, los métodos además comprenden formar los nanocristales magnéticos en la primera solución acuosa.

La invención además proporciona partículas terapéuticas. Estas partículas pueden comprender un estabilizador, un material magnético o magnetizable, un ácido graso o una de sus sales, y una proteína. El material magnético o magnetizable puede ser un material superparamagnético. El ácido graso puede comprender cualquier número de carbonos, y puede ser, por ejemplo, ácido oleico o una de sus sales, por ejemplo, una sal de calcio de ácido oleico. La proteína puede ser una enzima, y más preferiblemente puede ser una enzima antioxidante. La enzima antioxidante puede ser catalasa, superóxido dismutasa, o glutational peroxidasa. El estabilizador puede ser biotinilado.

Las partículas terapéuticas además pueden comprender uno o más anticuerpos. Los anticuerpos pueden facilitar el suministro de las partículas a una célula o tejido seleccionado particular, *in vitro* o, preferiblemente *in vivo*. El anticuerpo puede directamente incorporarse en la partícula, o puede recubrir las superficies de la partícula. El anticuerpo puede unirse a avidina o estreptavidina, e

específicamente unirse a antígeno en la superficie de una célula endotelial.

La invención también proporciona métodos para proteger las células del daño oxidante, por ejemplo, el daño oxidante causado por la exposición de la célula a una especie oxidante reactiva. En general, los métodos comprenden poner en contacto la célula con una partícula un material magnético o magnetizable y por lo menos una enzima antioxidante, y generar un campo magnético uniforme capaz de magnetizar el material magnético o magnetizable próximo a la célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula se internalice en la partícula. La enzima antioxidante puede ser catalasa, superóxido dismutasa, o glutathione peroxidasa. La partícula además puede comprender un anticuerpo que específicamente se une a un antígeno en la superficie de la célula. Los métodos pueden llevarse a cabo *in vitro*, o *in vivo*. La célula puede ser cualquier célula, tal como una célula epitelial o una célula endotelial. Algunas células preferidas son células de endotelio vascular.

#### **Breve Descripción de las Figuras**

La patente o la solicitud presentada contienen por lo menos una figura ejecutada en color. Las copias de esta patente o la publicación de la solicitud de patente con figuras en color serán provistas por la oficina descrita en la solicitud y el pago de la cuota necesaria.

La Figura 1B muestra la relación entre el rendimiento de las nanopartículas (NP) y la concentración del estabilizador.

La Figura 2 muestra el efecto de las nanopartículas magnéticas cargadas con taxol en la proliferación de células del músculo liso aórtico de rata cultivadas como una función de la cantidad de nanopartículas.

La Figura 3A muestra la expresión del transgen en células del músculo liso aórticas de rata cultivadas como una función de la cantidad de la formulación de poli-L-arginina y la dosis de la nanopartícula.

La Figura 3B muestra la expresión del transgen (Proteína Fluorescente Verde, GFP) en células endoteliales aórticas de bovino como una función de la cantidad de la formulación de poli-L-arginina y la dosis de nanopartícula.

La Figura 3C muestra la expresión del transgen en células endoteliales cultivadas como una función de la exposición magnética.

La Figura 3D muestra los cinéticos de la expresión del transgen en células endoteliales cultivadas tratadas con nanopartículas modificadas con poli-L-arginina a una dosis equivalente a  $285 \times 10^6$  de partículas virales por cavidad con o sin un campo magnético.

La Figura 4 muestra un sistema terapéutico asistido magnéticamente ilustrativo de acuerdo con una modalidad de la

ilustra un método ilustrativo para administrar un agente terapéutico a un dispositivo implantado y para obtener las nanopartículas del portador magnético que no se localizan en el dispositivo implantado, de acuerdo con una modalidad de la invención.

La Figura 6A resume una modalidad ilustrativa del sistema terapéutico magnéticamente asistido, en donde las nanopartículas del portador magnético modificado con albúmina con una etiqueta fluorescente roja se inyectaron en una rata que tiene una endoprótesis de acero intravascularmente implantado.

La Figura 6B resume los resultados de la distribución del agente terapéutico, para secuestrar el dispositivo implantado.

La Figura 7 resume esquemáticamente el sistema de recuperación mostrado en la Figura 5 que se utiliza para el modelo de recuperación de nanopartículas de portador magnético o células del ciclo de circulación cardiovascular.

La Figura 8 resume los cinéticos de consumo exponencial de nanopartículas del portador bajo la influencia de un gradiente de campo magnético.

La Figura 9 resume los cinéticos de consumo exponencial de células portadoras bajo la influencia de un gradiente de campo magnético.

ilustrativo mostrado en la Figura 5, afectan los cinéticos de depleción.

Las Figuras 11A y 11B resumen los resultados de la microscopía de electrón de transfección y del momento magnético contra el campo magnético (curva de magnetización) de nanopartículas superparamagnéticas estabilizadas con albúmina (MNP).

Las Figuras 12A y 12B resumen los estudios de carga celular MNP *in vitro* con respecto a los cinéticos de la absorción de la MNP y la disponibilidad de las células cargadas con MNP.

La Figura 13A muestra la transferencia del gen reportero mediada por MNP recubierto con polietilenimina combinado con proteína fluorescente verde que codifica ADN (GFP) presentadas como fluorescencia GFP a  $\lambda_{em}/\lambda_{ex}$  de 485 nm/535 nm como una función de una cantidad de las nanopartículas en células A10, en donde las nanopartículas cargadas con óxido de hierro se prepararon utilizando 0 ml de THF (nanopartículas grandes, LNP), 3 ml de THF (nanopartículas medias, MNP), o 4.5 ml de THF (nanopartículas pequeñas, SNP), en las fases orgánicas, contra nanopartículas grandes sin óxido de hierro (LNP No Mag, utilizado en la presente como un control).

La Figura 13B muestra la fluorescencia relativa

La Figura 13C muestra la internalización de las nanopartículas marcadas fluorescente (muy rojo) expresadas en la fluorescencia relativa medida a 650 nm/670 nm como una función de una cantidad de las nanopartículas en células A10.

La Figura 13D muestra la fluorescencia relativa medida a 650 nm/670 nm como una función de la cantidad de nanopartículas en BAEC.

La Figura 13E muestra la supervivencia celular como una función de la cantidad de nanopartículas en células A10.

La Figura 13F muestra la supervivencia celular como una función de la cantidad de nanopartículas en células BAEC.

La Figura 14 muestra la supresión de la expresión de eGFP en células del músculo liso transducidas con lentivirus (A10), a través de ARNsi suministrado con nanopartículas magnéticas en la presencia de un campo magnético (500 Oe).

La Figura 15A muestra las curvas de magnetización de endoprótesis de acero inoxidable de grado 304 (eje Y lado izquierdo) y 316L (eje Y lado derecho). La endoprótesis de acero inoxidable 304 exhibe un comportamiento casi superparamagnético que muestra una ligera histéresis y una magnetización remanente en el orden de 7% del valor de magnetización de saturación. Por comparación, la endoprótesis 316L muestra mucho menos sensibilidad magnética.

imágenes fluorescentes rojas que cualitativamente muestran la cantidad relativa de la MNP internalizado dentro de las células en diferentes puntos en el tiempo a una dosis de la MNP aplicada de 9 µg/cavidad. Las micrografías fluorescentes verdes muestran la viabilidad de las células según evaluado a través de la tinción Verde de Calceína.

La Figura 16A muestra los cinéticos de captura *in vitro* de BAEC magnéticamente sensible sobre una endoprótesis de acero inoxidable de grado 304 en la presencia de un campo uniforme de 1000 Gauss y un flujo no pulsátil con una velocidad de 30 ml/min. El grado de captura inicial se estimó como siendo 1% de células/minuto. Los datos se obtuvieron midiendo la fluorescencia de la MNP internalizada.

Las Figuras 16B y 16C muestran BAEC magnéticamente sensible capturado *in vitro* sobre una endoprótesis de célula estable 304 según evidenciado a través de la fluorescencia roja de la MNP internalizada, o a través de la tinción Verde de Calceína de células vivas, respectivamente.

La Figura 16D muestra la BAEC cargada en la MNP capturada *in vivo* sobre una endoprótesis de acero inoxidable 304 consumido en una arteria carótida de rata. La BAEC precargada con MNP fluorescente se inyectó transtorácicamente en la cavidad ventricular izquierda. Los animales se expusieron al campo magnético de 1000 Gauss durante 5 minutos incluyendo el periodo de inyección. Los animales se

través de microscopía de fluorescencia.

La Figura 16E muestra ratas de control sometidas a un procedimiento idéntico, en donde no se utilizó un campo magnético. Las micrografías (16B-16E) se obtuvieron a una amplificación de x40.

La Figura 16F muestra el suministro celular magnético local *in vivo* en un modelo de endoprótesis de carótida de rata bajo condiciones de detención de flujo. Se introdujo un catéter a través de la carótida externa en la arteria carótida común y se colocó distalmente a la endoprótesis consumida. La suspensión celular se suministró en los segmentos arterias aislados durante 15 segundos.

La Figura 16G muestra el suministro celular *in vivo* bajo condiciones de flujo sanguíneo no interrumpidas. Se introdujo un catéter a través de la carótida externa en la carótida común y se hizo avanzar más allá de la endoprótesis hacia el arco aórtico. Las células se inyectaron en este sitio a una velocidad de 1 ml/min durante un minuto. Para ambos protocolos de suministro (16F Y 16G), en el grupo magnético (Mag+) la inyección se llevó a cabo con animales colocados en un campo magnético de 1000 Gauss, y el campo se mantuvo durante un total de 5 minutos después del suministro. En las ratas de control (grupo Mag) no se aplicó ningún campo magnético. En ambas configuraciones las BAEC primero se transdujeron en un cultivo con luciferasa adenovirus y

administración perivascular local de luciferina mezclada con un gel Plurónico. La señal emitida del segmento arterial con endoprótesis debido a la expresión del transgen de luciferasa fue significativamente mayor en los animales que recibieron las células en la presencia de un campo magnético (grupo Mag+).

La Figura 17 muestra que un formador de imágenes de MRI puede magnetizar una endoprótesis de acero 316L para la selección de la célula. En la presencia de un campo magnético (Mag+), las BAEC precargadas con MNP de ácido poliláctico fluorescente rojo (PLA) se muestra que localizan la endoprótesis de acero magnetizada. Los controles (Mag-) no mostraron una localización significativa de la endoprótesis.

La Figura 18A es una imagen TEM de la MNP cargada en catalasa.

La Figura 18B es una gráfica que muestra el comportamiento magnético de la MNP.

Las Figuras 18C y 18D son gráficas de barras que muestran la distribución de tamaño de las MNP.

La Figura 19A muestra el porcentaje de actividad SOD retenido con relación a la masa agregada.

La Figura 19B muestra el porcentaje de masa de SOD localizado con relación a la masa agregada.

La Figura 20A muestra la carga de catalasa contra la adición medida a través de radio-rastreo de  $^{125}\text{I}$ -catalasa.

La Figura 20B muestra la actividad de la catalasa cargada según medida a través de la degradación de la absorbencia  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 242 nm con el tiempo.

La Figura 21A muestra la masa de catalasa agregada a la MNP contra la masa protegida de proteólisis de 0.2% en peso de Pronasa a  $37^\circ\text{C}$  con agitación durante 1 hora.

La Figura 21B muestra (—●—) la actividad de la catalasa cargada en la MNP contra el tiempo con exposición de 0.2% en peso de pronasa a  $37^\circ\text{C}$  y (—○—) la actividad libre de catalasa contra el tiempo contra tiempo con la exposición de 0.2% de pronasa a  $37^\circ\text{C}$ .

La Figura 22 muestra la estabilidad de la MNP en plasma a  $37^\circ\text{C}$  con el tiempo. La liberación de la catalasa medida a través de radio-rastreo de  $^{125}\text{I}$ -catalasa. La MNP se incubó con una solución de glucosa acuosa (5%) o plasma a  $37^\circ\text{C}$  con el tiempo. La liberación de la catalasa determinada por la centrifugación de la catalasa libre de partículas y la medición de la actividad en el sobrenadante contra la MNP retenida en un filtro del concentrador del microcentrífugo. (—●—) catalasa liberada de las MNP diluidas en una solución de glucosa. (—○—) catalasa liberada de las MNP diluidas en plasma de ratón heparinizado completo.

La Figura 23B muestra la micrografía fluorescente de la distribución magnética durante 10 minutos de la MNP conteniendo catalasa marcada con Dylight 488.

La Figura 23C muestra el suministro magnético de la MNP durante 5 minutos.

Las Figuras 23D y 23E muestran el suministro de la MNP durante 10 minutos sin campo magnético.

La Figura 23F muestra el control sin MNP.

Las Figuras 24A y 24B muestran la protección de HUVEC de la tensión oxidativa a través del suministro magnético de la MNP cargada con catalasa.

Las Figuras 25A y 25B ilustra la formación de partículas y la síntesis.

La Figura 26 muestra la afinidad de la MNP biotinilada.

La Figura 27 muestra la protección de HUVEC de la tensión oxidativa a través del suministro magnético de las MNP cargadas con catalasa y la protección de los HUVEC de la tensión oxidativa a través del suministro de anticuerpos seleccionados.

La Figura 28 muestra la biodistribución de la MNP modificada con Ab62 contra MNP modificada con IgG de control después de la inyección en la vena de la cola en ratones. La

### Descripción Detallada de la Invención

Varios términos relacionados con los métodos y otros aspectos de la invención se utilizan en toda la descripción y las reivindicaciones. Tales términos se darán con el significado común en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos específicamente definidos se construirán en una forma consistente con la definición provista en la presente.

Como se utiliza en esta descripción y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "uno", "una", y "el, la" incluyen las referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. De esta forma, por ejemplo, la referencia a "una partícula" incluye una combinación de dos o más partículas, y similares.

El término "aproximadamente" como se utiliza en la presente cuando se hace referencia a un valor miscible tal como una cantidad, una duración temporal, y similar, significa que abarca las variaciones de  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , más preferiblemente  $\pm 5\%$ , aun preferiblemente  $\pm 1\%$  y aún más de preferencia  $\pm 0.1\%$  del valor especificado.

"Polinucleótido", también referido como "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", se refiere a cualquier poliribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado.

una mezcla de las regiones monocatenaria y bicatenaria, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario, o más típicamente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, el polinucleótido se refiere a regiones de triple estructura de cadena que comprenden ARN o ADN, o ambos ARN y ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con cadenas principales modificadas para la estabilidad o por otras razones. Las bases modificadas incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Una variedad de modificaciones puede hacerse al ADN y al ARN; de esta forma, el polinucleótido abarca las formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de polinucleótidos como típicamente se encuentra en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y células. El polinucleótido también abarca polinucleótidos relativamente cortos, por lo general referidos como oligonucleótidos.

"Polipéptido" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces de péptido o enlaces de péptido modificados, es decir, isoésteres de péptido. El polipéptido se refiere a ambas cadenas cortas, comúnmente referidas como péptidos, oligopéptidos u oligómeros, las cadenas más largas, generalmente referidas como proteínas. Los polipéptidos

de aminoácido modificadas ya sea a través de procesos naturales, tales como el procesamiento post-traducción, o a través de técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones se describen bien en los textos básicos y en monografías más detalladas, así como literatura de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier lugar en un polipéptido, incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales del aminoácido, o el término amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o variables grados de varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones.

Excepto cuando se indica, "sujeto" o "paciente" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a cualquier animal, pero preferiblemente se refieren a mamíferos tales como humanos y primates no humanos, así como animales de compañía, de granja, o experimentales tales como conejos, perros, gatos, ratas, ratones, caballos, vacas, puercos y similares. Los humanos son los más preferidos.

"Cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se utilizan de manera intercambiable en la presente, y se refieren a una cantidad de un agente terapéutico, como se describe en la presente, efectivo para obtener un resultado biológico particular tal como, pero no

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el paciente desde el punto de vista farmacológico/toxicológico y de la fabricación del químico farmacéutico desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del agente(s) terapéutico y no es tóxico para el hospedero al cual se utiliza.

Se ha descubierto, de acuerdo con la presente invención que los agentes terapéuticos pueden seleccionarse para ubicaciones específicas en el cuerpo a través del uso de campos magnéticos uniformes para inducir la magnetización de los objetos magnetizables y para generar un gradiente de campo magnético. Además se ha descubierto que la sección magnética puede utilizarse para cualquier tipo de agente terapéutico, incluyendo compuestos farmacéuticos o químicos, biomoléculas y células. Por consiguiente, la invención además representa sistemas y métodos para magnéticamente seleccionar agentes terapéuticos para una o más ubicaciones deseadas en el cuerpo.

En un aspecto, los sistemas comprenden agentes terapéuticos provistos como parte de una formulación terapéutica. La formulación terapéutica puede comprender una

nanopartícula. La partícula asociada y el agente terapéutico como sinónimos son referidos en la presente como partículas terapéuticas. Las nanopartículas magnéticas incluyen partículas que son permanentemente magnéticas y aquellas que son magnetizables después de la exposición a un campo magnético externo, pero pierden su magnetización cuando se eliminan los campos. Los materiales que son magnéticos o magnetizables después de la exposición a un campo magnético que pierden sus propiedades magnéticas cuando el campo se remueve son referidos en la presente como un material superparamagnético. Las partículas superparamagnéticas son preferidas para evitar la agregación irreversible de las partículas. Los ejemplos de materiales superparamagnéticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, hierro, óxido de hierro mixto (magnetita), u óxido gama-férrico (maghemita), así como magnetitas sustituidas que incluyen elementos adicionales tales como zinc. Preferiblemente, el material superparamagnético está en la forma de uno o más nanocristales, por ejemplo, sistemas cristalinos de un solo dominio con por lo menos una dimensión  $\leq 100$  nm. Un nanocristal es cualquier nanomaterial con por lo menos una dimensión  $\leq 100$  nm y que es cristalino individual, o monocristalino, formado de una sola unidad de corteza, por lo que todos los elementos tienen una orientación cristalográfica idéntica de los ejes c- y a- y se ramifican como una unidad. Cualquier partícula que exhibe regiones de

Los cristales ferromagnéticos pueden estar comprendidos de dominios magnetizados del tamaño de un micrón. El superparamagnetismo puede ocurrir cuando el tamaño de los cristales es menor que el dominio ferromagnético (~30 nm). Las propiedades superparamagnéticas pueden depender de la temperatura. La temperatura puede, bajo algunas condiciones, desestabilizar el magnetismo. Sin pretender estar limitado a cualquier teoría particular o mecanismo de acción, se cree que la energía térmica puede evitar la alineación de los momentos magnéticos presentes en los materiales superparamagnéticos. Después de la remoción de un campo magnético aplicado, los momentos magnéticos de los materiales superparamagnéticos aún existen, pero están en un movimiento rápido, causando un momento magnético orientado o desordenado aleatoriamente y, de esta forma, no un campo magnético neto. A la temperatura de los sistemas biológicos y en los campos magnéticos aplicados de los formadores de imágenes MR, los materiales superparamagnéticos son menos magnéticos que sus contrapartes ferromagnéticas. Por ejemplo, se ha observado que el magnetismo de pequeños óxidos de hierro superparamagnéticos disminuye a temperaturas elevadas (Berkowitz y otros, (1968) J. Appl. Phys. 39:1261).

Los nanocristales superparamagnéticos pueden estar en el intervalo en el tamaño de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm, dependiendo de, entre otras cosas, el método de preparación y la composición del medio.

material. Más preferiblemente, los nanocristales son de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 20 nm.

En algunos aspectos, la partícula es nanocristal compuesto. El nanocristal compuesto puede comprender más de un nanocristal magnético o magnetizable individual y uno o más materiales biocompatibles insolubles en agua para mantener los cristales juntos. Los materiales biocompatibles pueden ser un polímero, que puede ser biodegradable o no biodegradable. Los ejemplos no limitantes de tales polímeros incluyen poli(uretano), poli(éster), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(lactida-co-glicolida), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(etilenoimina), poli(estireno), poli(amida), caucho, caucho de silicón, poli(acrilonitrilo), poli(acrilato), poli(metacrilato), poli(ácido  $\alpha$ -hidroxi), poli(dioxanona), poli(ortoéster), poli(éter-éster), poli(lactona), poli(alquilcianoacrilato), poli(anhídrido), poli(acetato de etilenvinilo), poli(hidroxibutirato), poli(tetrafluoroetileno), poli(tereftalato de etileno), polioxietileno, copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, sus mezclas y copolímeros de los monómeros correspondientes.

Las nanopartículas poliméricas con nanocristales superparamagnéticos incorporados pueden prepararse de acuerdo con cualquier medio adecuado en la técnica. Por ejemplo, las nanopartículas pueden prepararse dispersando los

estabilizador adecuado, y finalmente se elimina el solvente para obtener las nanopartículas solidificadas. Las condiciones de la preparación de nanopartículas no deberá dañar el agente terapéutico que se va a incorporar. La temperatura para la separación de nanopartículas preferiblemente está en el intervalo de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, aunque a temperaturas mayores o inferiores pueden utilizarse. Los ejemplos no limitantes de las formas para preparar nanopartículas superparamagnéticas para aplicaciones biológicas se describen en Patentes de E. U. A. Nos. 7,175,912 y 7,175,909, y Publicaciones de E. U. A. 20050271745. Las nanopartículas magnéticas, la información para el desarrollo de nanopartículas magnéticas, y los reactivos para la preparación de nanopartículas (MNP, por sus siglas en inglés) están comercialmente disponibles.

Las partículas pueden estar compuestas de sales/complejos de lípidos aniónicos, por ejemplo, ácidos grasos y fosfatos lípidos con cationes biocompatibles polivalentes. Las partículas pueden formarse bajo condiciones ligeras a través de la combinación de soluciones acuosas respectivas en la presencia de estabilizadores coloides, de esta forma evitando el uso de solventes orgánicos y sin la necesidad de una entrada de energía mecánica externa.

En algunos aspectos, las partículas son nanopartículas bio-reabsorbibles, incluyendo las preparadas

menos un agente terapéutico, y por lo menos un material magnético o magnetizable.

Para preparar nanopartículas bio-reabsorbibles, se proporciona una primera solución acuosa. La primera solución acuosa comprende i) una sal soluble en agua de un ácido graso mono-carboxílico, o una de sus sales, o un fosfato/fosfonato lípido, ii) un estabilizador, y iii) un agente terapéutico. Las sales solubles ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, sales de litio, sodio, amonio y potasio. Una solución acuosa de una sal de ácido graso puede prepararse, por ejemplo, a través de la adición del ácido graso y una base, tal como hidróxido de sodio, al agua y disolver el ácido graso.

Los ácidos grasos que pueden utilizarse incluyen ácidos grasos monocarboxílicos saturados e insaturados de cadena recta y ramificada que tienen 8 o más átomos de carbono, particularmente de 8 a 30 átomos de carbono. Los ácidos grasos monocarboxílicos típicos incluyen ácido caprílico (ácido octanoico), ácido 2-etil octanoico, ácido cáprico (ácido decanoico), ácido 2-etil-decanoico, ácido 11-undecenoico, ácido undecanoico, ácido 2-etil-dodecanoico, ácido cis-5-dodecenoico, ácido lauroleico (ácido cis-9-dodecanoico), ácido traumático (ácido 2-dodecenoico), ácido láurico (ácido dodecanoico), ácido brasílico (ácido tridecanoico), ácido 2-etil-tetradecanoico, ácido

hexadecanoico, ácido palmitoleico (ácido cis-9-hexadecanoico), ácido palmítico (ácido hexadecanoico), ácido heptadecanoico, ácido margárico (ácido heptadecanoico), ácido petrosélico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 2-etil-octadecanoico, ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico), ácido elaídico (ácido trans-9-octadecenoico), ácido asclepínico (ácido cis-11-octadecenoico), ácido vacénico (ácido trans-11-octadecenoico), ácido taxoléico (cis, cis-5,9-octadecadienoico), ácido linoleico (cis, cis-9,12-octadecadienoico), ácido linolénico (cis, cis, cis-9,12,15-octadecatrienoico), ácido esteárico (ácido octadecanoico), ácido tuberculoesteárico (ácido 10-metil octadecanoico), ácido nonadecanoico, ácido 2-etil-eicosanoico, ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), ácido cis-8,11,14-eicosatrienoico, ácido gadoleico (ácido cis-9-eicosenoico), ácido gondóico (ácido cis-11-eicosenoico), ácido araquídico (ácido eicosanoico), ácido 2-ocildodecanoico, ácido erúcico (ácido cis-13-docosenoico), ácido behénico (ácido docosanoico), ácido tricosanoico, ácido selacoleico (ácido cis-15-tetracosanoico), ácido lignocérico (ácido tetracosanoico), ácido ximénico (ácido cis-17-hexacosenoico), y ácido hexacosanoico. Un ácido graso particularmente preferido es ácido oleico. Las sales de ácidos grasos, incluyendo por ejemplo, sales de metal alcalino y sales de metal alcalinotérreo, sales amonio, también pueden utilizarse.

solubles en agua que tienen 8 o más átomos de carbono, más preferiblemente de 8 a 30 átomos de carbono, también pueden utilizarse. Tales fosfatos incluyen sal disódica de  $\alpha$ -tocoferol fosfato, sal disódica de oleil fosfato, y sales disódicas de ésteres de fosfato de cadena recta o ramificada, monoalcoholes saturados e insaturados que tienen 8 o más átomos de carbono, tales como las sales disódicas de ésteres de fosfato de n-decanol, n-dodecanol, n-tetradecanol, n-hexadecanol, y n-octadecanol.

Los ácidos hidroxí tales como ácido 11-hidroxí-undecanoico, ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxí-cis-9-octadecenoico), ácido lesquerólico (ácido 14-hidroxí-cis-11-eicosenoico: 20:1-OH), ácido densipólico (ácido 12-hidroxí-cis, cis-9,15-octadecadienoico) ácido auricólico (ácido 14-hidroxí-cis, cis-11,17-eicosadienoico), ácido 9,10-dihidroxíoctadecanoico, ácido 9,14-dihidroxíoctadecanoico, y ácido felónico (ácido 22-hidroxídocosanoico) y sus sales también pueden utilizarse.

Los fosfatos lípidos, tales como las sales de monofosfatos solubles en agua de alcoholes que tienen 8 o más átomos de carbono, más preferiblemente de 8 a 30 átomos de carbono, también pueden utilizarse. Tales fosfatos incluyen sal disódica de  $\alpha$ -tocoferol fosfato, sal disódica de oleil fosfato, y sales disódicas de ésteres de fosfato de cadena recta o ramificada, monoalcoholes saturados e insaturados que tienen 8 o más átomos de carbono, tales como las sales

Un estabilizador coloidal, o una mezcla de estabilizadores coloidales, pueden agregarse a la solución acuosa de la sal de ácido graso o la solución acuosa que contiene el polication. Los estabilizadores coloidales son materiales que se cree que se adsorben sobre las nanopartículas por lo tanto proporcionando una protección de carga o estérica de las partículas de la agregación. Los estabilizadores adecuados incluyen coloides secundarios, tales como gelatina, agar-agar, almidón, derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa e hidroxipropil celulosa, y proteínas tales como albúmina. Los agentes tensioactivos no iónicos, tales como óxido de polietileno, copolímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno, por ejemplo, agentes tensioactivos de PLURONIC®, y ésteres de ácido graso etoxilados de ésteres de sorbitol, tales como monolaureato de polioxietilen (20) sorbitán (TWEEN® 20), monopalmitato de polioxietilen (20) sorbitán (TWEEN® 40), monoestearato de polioxietilen (20) sorbitán (TWEEN® 60), monooleato de polioxietilen (20) sorbitán (TWEEN® 80), o trioleato de polioxietilen (20) sorbitán (TWEEN® 85) pueden también utilizarse. Un estabilizador preferido es albúmina. PLURONIC es una marca comercial registrada de BASF Corporation y TWEEN es una marca comercial registrada de Croda International PLC.

Una segunda solución acuosa que comprende una sal soluble en agua de un metal biocompatible polivalente o

en cantidades utilizadas, y también no presenta ser significativamente dañino o tener efectos secundarios en el cuerpo del receptor. Los cationes polivalentes biocompatibles útiles incluyen sin limitación  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Sr}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , y  $\text{Cu}^{+2}$ , poliarginina, protamina. Los cationes polivalentes biocompatibles preferidos incluyen  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ .

El tamaño de las partículas bio-reabsorbibles puede fácilmente controlarse y adaptarse para aplicaciones específicas mediante el ajuste de la cantidad del estabilizador, la sal lípida, y el catión biocompatible polivalente. Aunque las partículas generalmente son lipófilas, mostrando una alta afinidad a los agentes terapéuticos hidrófobos, los agentes terapéuticos solubles en agua iónicos también pueden encapsularse como sus sales/complejos insolubles en agua en el procedimiento de la formación de partículas. La naturaleza y la cantidad de la sal lípida y el catión biocompatible polivalente puede variar con el fin de ajustar la lipofilicidad relativa de las partículas resultantes.

Un péptido catiónico, una proteína catiónica, o una mezcla de péptidos catiónicos y/o proteínas catiónicas también se puede agregar a la segunda solución acuosa que contiene un polication metálico. Los péptidos catiónicos preferidos contienen por lo menos 50%, preferiblemente al menos 60% y más preferiblemente al menos aproximadamente 85% de residuos de aminoácido básicos, tales como

aproximadamente 1000 residuos. Los péptidos catiónicos más preferidos incluyen polipéptidos ricos en arginina, tales como poli-L-arginina. Los péptidos más preferidos son proteínas ricas en arginina, tales como protamina. Las proteínas ricas en guanidinio también pueden utilizarse. Los polímeros orgánicos sintéticos (sustancias de tipo polipéptido), tales como polietilenimina, también pueden utilizarse.

Las nanopartículas bio-reabsorbibles pueden hacerse magnéticas a través de la inclusión de nanocristales magnéticamente sensibles en su estructura, por ejemplo, combinando una suspensión fina de tales cristales (un ferro-fluido) con una solución lípida aniónica antes de suspenderlos en un fluido portador, tal como agua. La preparación de tales nanopartículas es un proceso de dos pasos que consiste de 1) hacer la suspensión fina de nanocristales magnéticos (ferro-fluido), en la presencia de un lípido aniónico, y 2) formar nanopartículas a través de la precipitación controlada de lípido aniónico con un catión polivalente en la presencia de un estabilizador y un agente terapéutico. En un aspecto, las nanopartículas magnéticas se preparan a través de la agregación controlada de un ferro-fluido estabilizado con oleato con  $\text{Ca}^{+2}$ .

Para preparar un ferro-fluido, una solución acuosa que contiene sal férrica soluble en agua ( $\text{Fe}^{+3}$ ), tal como

de sodio acuosa para formar un precipitado magnético que contiene nanocristales magnéticos. Una sal soluble en agua de un ácido graso, tal como una solución acuosa de oleato sódico, se adiciona, y los nanocristales magnéticos se vuelven a suspender por calentamiento, por ejemplo, en una atmósfera inerte, tal como bajo argón. Un estabilizador tal como albúmina puede agregarse, junto en el agente terapéutico, ya sea a la primera solución acuosa, que comprende los nanocristales magnéticos, el estabilizador, la sal soluble en agua de un ácido graso mono-carboxílico, y el agente terapéutico, o la segunda solución acuosa, que comprende el catión biocompatible polivalente. La segunda solución después se agrega para formar las nanopartículas magnéticas.

En algunos aspectos, el agente terapéutico puede unirse o atarse a la superficie de una nanopartículas preformada. La unión puede ser de acuerdo con cualquiera de los medios adecuados para la aplicación terapéutica en la cual el agente se va utilizar, o de acuerdo con las propiedades químicas del agente o de las nanopartículas. Por ejemplo, la unión puede ser a través de adsorción, interacciones electroestáticas, complejo de carga o la unión covalente, incluyendo el uso de biomoléculas atadas. Los ejemplos no limitantes de procedimientos para asociar agentes terapéuticos con nanopartículas se describen en las Patentes de E. U. A. Nos. 7.081.489. 6.048.515. 6.576.221. v

de enlace incluyen avidina o estreptavidina y biotina, tiol y succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) o succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), o variantes adecuadas o sus isoformas, y folato y el receptor de folato.

Las nanopartículas magnéticas asociadas con el agente terapéutico pueden estar en el intervalo de tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 nm. El tamaño puede variar de acuerdo con cualquier variable apropiada. Preferiblemente, el intervalo de nanopartículas en tamaño es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 200 nm, y más preferiblemente de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm.

La partícula puede derivatizarse, y la superficie de la partícula puede modificarse para facilitar la derivatización. Por ejemplo, las partículas pueden recubrirse con un polímero reactivo al tiol y fotoactivable. La irradiación puede facilitar la unión covalente del polímero de superficie, y los grupos reactivos de tiol pueden posteriormente utilizarse para unir los agentes que proporcionan propiedades de cautela en la circulación sanguínea y/o a la unión específica a un tejido objetivo. La actividad fotoquímica de las superficies para unir el biomaterial se describen en la Publicación de E. U. A. No. 20060147413.

obtenerse previniendo la opsonización y la depuración a través del sistema inmunitario del sujeto recubriendo la partícula con un polímero hidrófilo biocompatible tal como polietilenglicol o dextrano, o recubriendo la partícula con albúmina para inhibir la unión de los opsoninos a la superficie de la partícula.

La preparación de las partículas modificadas puede avanzar de acuerdo con cualquier medio adecuado en técnica. Por ejemplo, puede producirse un agente magnéticamente sensible, óxido de hierro. La dispersión fina del óxido de hierro en un solvente orgánico adecuado que típicamente se obtiene como sigue: una solución acuosa que contiene cloruro férrico y ferroso se mezcla con una solución acuosa de hidróxido de sodio. El precipitado se recubre con ácido oleico a través de una corta incubación a 90°C en etanol. El precipitado se lava una vez con etanol para eliminar el ácido libre y se dispersa en cloroformo.

La dispersión orgánica resultante del óxido de hierro en cloroformo se utiliza para disolver un polímero biodegradable, ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés) o sus conjugados de polietilenglicol (PLA-PEG, por sus siglas en inglés), de esta manera formando la fase orgánica. La fase orgánica se emulsiona en una solución de albúmina acuosa (1%) por sonicación en un baño helado seguido por evaporación del solvente orgánico. Las partículas se

En un aspecto alternativo, se puede utilizar una modificación de superficie post-formación. Por ejemplo, las partículas pueden formarse utilizando un polímero foto-reactivo (por ejemplo, PBPC/PBMC, polímero de polialilamina-benzofenona-piridilditio/maleimido-carboxilato) como un estabilizador en la fase acuosa. La irradiación ultravioleta breve posterior se logra a través de la unión covalente del polímero a las nanopartículas magnéticas. Las partículas resultantes se hacen reaccionar en suspensión con un polietilenglicol tiolado, que permite un mejor control sobre el tamaño de las partículas y el grado de modificación de superficie.

Los agentes terapéuticos incluyen cualquier molécula que pueda asociarse con una partícula y utilizarse en los sistemas y métodos de la presente invención. Los agentes pueden ser moléculas purificadas, moléculas sustancialmente purificadas, moléculas que son uno más componentes de una mezcla de compuestos, o una mezcla de un compuesto con cualquier otro material. Los agentes pueden ser químicos orgánicos o inorgánicos, radioisótopos, compuestos farmacéuticos, sales farmacéuticas, pro-fármacos, o biomoléculas, y uno de sus fragmentos, análogos, homólogos, conjugados y derivados. Las biomoléculas incluyen, sin limitación, proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos, monosacáridos y todos sus fragmentos, análogos, homólogos, conjugados y derivados. Los agentes

composición indefinida que comprende uno o más compuestos. Los ejemplos de composiciones indefinidas incluyen extractos de células y tejidos, medios de crecimiento en donde las células procariotas, eucariotas arcabacterianas han sido cultivadas, caldo de fermentación, colecciones de expresión de proteína y similares. Los agentes también pueden ser una o más células, incluyendo células eucariotas o procariotas, y pueden ser uno o más virus. Los agentes terapéuticos pueden ser provistos en o por el contrario estar asociados con un portador tal como un portador farmacéuticamente aceptable.

El agente terapéutico también incluye sistemas de vectores virales, que se utilizan en la terapia génica. Un número de sistemas de vector viral bajo desarrollo, tales como adenovirus, virus asociado con adeno, retrovirus y el virus de *Herpes simplex*. Una de las formas más exitosas de introducir el gen de interés en la línea celular apropiada utiliza adenovirus recombinante. Los adenovirus son partículas sin envoltura que tienen un diámetro de aproximadamente 70 nm, y contienen un ADN bicatenario lineal de aproximadamente 36,000 pares base. Estos pueden fácilmente prepararse con altas concentraciones y pueden infectar un amplio intervalo de células, incluyendo las células no de división. El adenovirus recombinante también puede utilizarse en la vacunación mediante la expresión de un producto génico que clasifica una respuesta inmunitaria.

aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm en diámetro. Los retrovirus han sido ampliamente utilizados como vectores para suministro de ADN. Los virus de *Herpes simplex* tienen un diámetro de partícula de aproximadamente 100 nm, y contienen el virus de ADN monocatenario, envuelto, de aproximadamente 150,000 pares base. Estos virus tienen una gran capacidad de carga para genes foráneos y son capaces de infectar un amplio intervalo de células. Además, el genoma viral permanece episomal después de la infección, de esta forma eliminando la posibilidad de la mutagénesis por inserción maligna oportunista del genoma hospedero. Los virus *Herpes* han sido explotados para ensayos de transferencia génica específicos en el sistema nervioso central.

Se pueden incluir múltiples agentes en una partícula. Los expertos en la técnica pueden determinar la combinación particular de agentes, con base en por ejemplo, la afección a ser tratada, o las necesidades del sujeto particular. Por ejemplo, pueden utilizarse los agentes adicionales que modulan la actividad de un agente primario, que reducen el dolor, que soportan el crecimiento de células terapéuticas, y agentes antitrombogénicos, antiapoptóticos, antiinflamatorios, inmunosupresores o antioxidantes comúnmente utilizados en la técnica para tratar la enfermedad de interés.

Los agentes terapéuticos también pueden formularse

como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de ión, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, una sal moderadamente soluble. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos adecuados para utilizarse como portadores para fármacos hidrófobos.

En algunos aspectos preferidos, los agentes terapéuticos son enzimas. Por ejemplo, las enzimas antioxidantes pueden utilizarse. Las enzimas antioxidantes incluyen, sin limitación, catalasa, superóxido dismutasa, y glutatióna peroxidasa. Otros ejemplos de proteínas incluyen anticuerpos. Cualquier anticuerpo adecuado para el propósito para el cual la partícula se está utilizando puede incluirse. Los anticuerpos pueden ser el agente terapéutico, o pueden utilizarse para ayudar a guiar la partícula hacia el tejido seleccionado.

En algunos aspectos preferidos, los agentes terapéuticos son ácidos nucleicos reguladores. Por ejemplo, los ácidos nucleicos reguladores pueden utilizarse para facilitar la silenciación génica post-transcripción (silenciación del ARN). La silenciación del ARN involucra el procesamiento de ARN bicatenario (ARNds) en 21-28 fragmentos de nucleótido pequeños a través de una enzima basada en RNase H. Los productos de la separación son ARNsi (ARN de interferencia pequeña) o ARNmi (micro-ARN), que regulan la expresión génica en una forma específica de la secuencia. Los

Los ARNsi de esta forma pueden comprender moléculas de ARN que tienen una región bicatenaria de aproximadamente 19 nucleótidos en longitud con 1-2 terminales 3' de nucleótido en cada estructura de cadena, dando como resultado una longitud total de entre aproximadamente 21 y 23 nucleótidos. Como se utiliza en la presente, ARNsi también incluye varias estructuras de ARN que pueden procesarse *in vivo* para generar varias moléculas. Tales estructuras incluyen estructuras de cadena ARN que contienen dos elementos complementarios que se hibridan entre sí para formar un tallo, un bucle, y opcionalmente una terminal, preferiblemente una terminal 3'. Preferiblemente, el tallo es de aproximadamente 19 bp de longitud, el bucle es de aproximadamente 1-20, más preferiblemente de aproximadamente 4-10, y más preferiblemente de aproximadamente 6-8 nt de longitud y/o la terminal es de aproximadamente 1-20, y más preferiblemente de aproximadamente 2-15 nt de longitud. En ciertas modalidades de la invención el tallo es mínimamente de 19 nucleótidos en longitud y puede ser de hasta aproximadamente 29 nucleótidos en longitud. Los bucles de 4 nucleótidos o mayores es menos probable que se sometan a restricciones estéricas que los bucles más cortos y por consiguiente pueden ser preferidos. La terminal puede incluir un fosfato 5' y un hidroxilo 3'. La terminal puede, pero no necesariamente comprende una pluralidad de residuos U, por ejemplo, entre 1 y 5 residuos U.

longitud. Se cree que se derivan de precursores más grandes conocidos como ARN temporales pequeños (ARNst) o precursores de ARNm, que típicamente son de aproximadamente 70 nt de longitud con aproximadamente un bucle de 4-15 nt.

Los vectores virales o los vectores de ADN que codifican ARN de horquilla corta (ARNsh) que se procesan en el citoplasma celular para ARN de interferencia corta (ARNsi) también pueden utilizarse. Un plásmido que contiene una secuencia de ADN que codifica una secuencia de ARNsi deseada particular puede suministrarse a la célula objetivo, y posteriormente internalizarse, por ejemplo, a través de infección viralmente mediada. Una vez en la célula, la secuencia de ADN se transcribe continuamente en moléculas de ARN que ciclan de nuevo sobre sí mismas y forman estructuras de horquilla a través del par base intra-molecular. Estas estructuras de horquilla, una vez procesadas por la célula, son equivalentes a moléculas de ARNsi transfectadas y se utilizan a través de la célula para mediar el iARN de la proteína deseada. El uso de ARNsh tiene una ventaja sobre ARNsi como el anterior puede conducir a una inhibición a largo plazo, estable de la expresión de la proteína. En casos en donde son necesarios periodos más largos de inhibición proteica, el ARNsh como el agente terapéutico es preferible.

En algunos aspectos preferidos, el agente terapéutico es una o más células. Por ejemplo, la célula

Sobre-crecimiento Sanguíneo (BOED, por sus siglas en inglés), una célula madre de adulto o células madre de la sangre del cordón umbilical (CBSC, por sus siglas en inglés), células madre pluripotentes inducidas, por ejemplo, células de la piel que se programan para transformarse en células madre pluripotentes con además el potencial de diferenciarlas en la célula con por lo menos un genotipo endotelial. En algunos aspectos ilustrativos, la célula es una célula vascular tal como una célula endotelial vascular. Las células endoteliales pueden ser autólogas, heterólogas, o derivarse ya sea de sangre, médula espinal, o biopsia tisular. Las células endoteliales de biopsia tisular pueden derivarse de arterias, venas, tejido adiposo, o cualquier otro tejido con el potencial de contener células endoteliales o sus progenitores.

En algunos aspectos, los sistemas comprenden un dispositivo implantable. Cualquier dispositivo implantado conocido o utilizado en la técnica puede utilizarse en los sistemas de la invención. Los ejemplos no limitantes de dispositivos implantables adecuados incluyen endoprótesis, válvulas cardíacas, suturas con cable, reemplazos de articulaciones temporales y dilatadores urinarios, implantes ortopédicos tales como prótesis de articulaciones, tornillos, grapas, clavos, tuercas, pernos, placas, varillas, terminales, cables, insertos, osteopuertos, sistemas halo y otros dispositivos ortopédicos utilizados para la

incluyen dispositivos no ortopédicos, colocaciones temporales e implantes permanentes, tales como dispositivos de traqueotomía, conductos de drenaje, jejunostomía y tubos de gastrostomía, e implantes intrauretrales y otros implementes genitourinarios, estiletes, dilatadores, sujetadores y filtros vasculares, marcapasos, guías por cable y puertos de acceso de catéteres vasculares subcutáneamente implantados, chips electrónicos, implantes micro-electrónicos y de transmisión/recepción, micro-dispositivos de suministro de fármacos implantables, biosensores implantables, dispositivos de micro-video implantables, y dispositivos de microbaterías implantables. Un dispositivo implantable altamente preferido es una endoprótesis. La endoprótesis puede ser una endoprótesis que eluye el fármaco.

Preferiblemente el dispositivo implantable comprende un material magnético o magnetizable. Más preferiblemente, tales materiales magnéticos o magnetizables son biocompatibles. El dispositivo puede modificarse para ser biocompatible. Por ejemplo, las modificaciones de superficie de los soportes metálicos para mejorar la biocompatibilidad como se describe en Publicación de E. U. A. No. 2003/0044408.

El acero inoxidable, por ejemplo, el Acero Inoxidable de Grado 304 es un ejemplo no limitante preferido del material que puede utilizarse en un dispositivo implantable. Otros ejemplos incluyen las aleaciones de cromo-

El dispositivo puede implantarse en cualquier lugar en el cuerpo del sujeto. En algunos aspectos preferidos, el dispositivo se implanta en el sistema vascular del sujeto, por ejemplo, en un vaso sanguíneo tal como una vena, arteria o capilar. Cuando se utilizan las endoprótesis, las endoprótesis pueden implantarse en cualquier conducto tal como el conducto hepático, el conducto biliar, partes del sistema digestivo tales como el esófago, el estómago, los intestinos, o el colón, partes del sistema respiratorio tales como la tráquea o los bronquios, o partes del sistema excretor tales como el uréter, uretra, o el conducto excretor renal. Otros implantes incluyen implantes oculares y semillas radioactivas.

En algunos aspectos, los sistemas pueden comprender un sistema de recuperación. En general, el sistema de recuperación puede utilizarse para capturar y contener partículas terapéuticas que no llegan al sitio objetivo, o para capturar y contener partículas después de que el agente terapéutico ha sido suministrado al sitio objetivo, como sinónimos referidos en la presente como partículas consumidas. Las partículas no utilizadas o consumidas pueden entrar o permanecer en la sangre del sujeto, y pueden producir efectos secundarios en el sujeto. Para minimizar los riesgos en el sujeto, se prefiere remover tales partículas sin utilizar y/o consumidas. El sistema de recuperación preferiblemente captura y contiene la mayor parte, y más

particular, órganos, apéndices, y similares dentro del cuerpo sustancialmente libres de partículas consumidas o sin utilizar.

En algunos aspectos preferidos, el sistema de recuperación comprende un material magnético o magnetizable. El material puede ser provisto en cualquier forma adecuada en la técnica. Por ejemplo, el material puede ser una varilla, placa, perla, tubo, cable, panel, filtro, rejilla, malla, y similar. La forma particular (geometría) no es crítica, y puede variar de acuerdo con cualquier número de variables.

El sistema de recuperación es preferiblemente biocompatible. Los materiales adecuados que pueden utilizarse para comprender el sistema de recuperación incluyen, pero no se limitan a, acero inoxidable tal como el acero inoxidable 316L, acero inoxidable de la serie 400, incluyendo el grado 430 también puede utilizarse en algunos casos, tales como aquellos para un uso a corto plazo en donde las propiedades corrosivas a largo plazo potenciales de los materiales del sistema de recuperación no son de preocupación.

Preferiblemente, el sistema de recuperación se configura de tal forma que es capaz de estar reversiblemente conectado al sujeto. El sistema de recuperación puede reversiblemente conectarse al sujeto en cualquier lugar en el cuerpo adecuado de acuerdo con el uso terapéutico para el cual el sistema general se está utilizando. Por ejemplo, el

sistema particular. Preferiblemente, el sistema de recuperación está reversiblemente conectado a por lo menos un vaso sanguíneo, y más preferiblemente al lumen del vaso sanguíneo para permitir que la sangre fluya directamente dentro del sistema de recuperación. El sistema circulatorio es un sistema bien accedido, de alto flujo, y de esta forma es altamente preferido para la conexión a un sistema de recuperación.

En algunos aspectos, el sistema de recuperación está indirectamente conectado al sujeto. Por ejemplo, un fluido biológico del sujeto puede removerse y ponerse en contacto con el sistema de recuperación. Los fluidos biológicos pueden incluir, pero no se limitan a, sangre, fluido cerebroespinal, fluido de ascitos, bilis, fluido amniótico, leche, saliva, fluido cervicular gingival, orina, fluido mucoso, fluido renal, y similar. Después de que las partículas se secuestran del fluido biológico, el fluido biológico puede regresarse al sujeto. La sangre es un fluido biológico particularmente preferido. De esta forma, por ejemplo, la sangre del sujeto puede removerse del cuerpo, ponerse en contacto con el sistema de recuperación, y devolverse al cuerpo a través de transfusión. La sangre puede separarse en sus componentes, o puede permanecer como sangre entera.

Las partículas dirigidas para el sistema de

recuperación puede removerse del sujeto.

Las partículas que comprenden por lo menos un agente terapéutico y por lo menos otro material magnético o magnetizable se seleccionan para una o más ubicaciones deseadas en el cuerpo, por ejemplo, el uno o más dispositivos implantados en el cuerpo, a través de un campo magnético. De esta forma, los sistemas de la invención pueden comprender un generador de campo magnético. El generador de campo magnético puede incluir un magneto externo, que incluye un dispositivo formador de imágenes de resonancia magnética. En algunos aspectos, el generador de campo magnético se configura para generar por lo menos un gradiente de campo magnético dirigible. El gradiente de campo magnético puede dirigir la partícula al dispositivo implantable. El gradiente de campo magnético puede dirigir las partículas no suministradas al dispositivo hacia el sistema de recuperación, o puede dirigir las partículas consumidas, es decir, las partículas que han sido exitosamente suministradas y se han consumido del agente terapéutico para el sistema de recuperación. Un gradiente de campo magnético individual puede utilizarse para dirigir las partículas hacia el dispositivo implantable, y después reconfigurarse para dirigir las partículas no utilizadas o consumidas existentes hacia el sistema de recuperación. Alternativamente, se pueden producir múltiples gradientes y utilizarse, con por lo menos un gradiente que dirige las partículas al dispositivo implantado. y por lo menos un

dispositivo implantado, y puede generarse próximo al sistema de recuperación.

Haciendo referencia a la Figuras 4 y 5, se ilustra un sistema terapéutico magnéticamente asistido ilustrativo 100. El sistema terapéutico 100 comprende un dispositivo 104 que ha sido implantado en un sujeto mamífero (no mostrado), un generador de campo magnético 106, configurado para generar un gradiente de campo magnético externo al sujeto que se dirige próximamente al dispositivo implantado 104, y una partícula terapéutica 102 que ha sido administrada al sujeto. El dispositivo 104 puede ser un dispositivo vascular que ha sido implantado en el sistema vascular del sujeto mamífero.

También se representan de acuerdo con la presente invención métodos para magnéticamente seleccionar una partícula terapéutica para una o más ubicaciones deseadas en o sobre un sujeto. En algunos aspectos preferidos, los métodos se aplican para magnéticamente seleccionar una partícula terapéutica para un dispositivo implantado en un sujeto.

Los métodos pueden comprender administrar a un sujeto que tiene un dispositivo implantado que comprende por lo menos un material magnético o magnetizable biocompatible, una partícula terapéutica que comprende por lo menos un agente terapéutico y por lo menos un material magnético o magnetizable, generar un gradiente de campo magnético próximo

partículas no suministradas al dispositivo implantable, o remueve las partículas consumidas.

El agente terapéutico puede ser cualquier molécula como se describe o ejemplifica en la presente, incluyendo sin limitación, un fármaco, biomolécula o célula. El dispositivo implantado puede ser cualquier dispositivo utilizado, conocido o por el contrario adecuado en la técnica tales como los descritos ejemplificados en la presente.

En algunos aspectos preferidos, los métodos son aplicados para seleccionar magnéticamente una partícula terapéutica para una célula o tejido particular. Estos métodos pueden llevarse a cabo *in vitro*, y preferiblemente llevarse a cabo *in vivo*. De esta forma, por ejemplo, las partículas terapéuticas pueden seleccionarse magnéticamente para una ubicación particular en el cuerpo de un sujeto. La ubicación no necesita tener un dispositivo implantado. Un campo magnético puede utilizarse para guiar la partícula a la ubicación deseada, y puede utilizarse para facilitar la internalización de la partícula terapéutica mediante células particulares en la ubicación deseada.

En algunos aspectos detallados, estos métodos se pueden utilizar para proteger células de daño oxidante. De esta forma, por ejemplo, los métodos para proteger una célula del daño oxidante comprenden poner en contacto la célula con una partícula que comprende un material magnético o

material magnético o magnetizable próximo a la célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula se internalice en la partícula. La célula puede estar *in vitro* o *in vivo*. La célula puede ser una célula endotelial, por ejemplo, una célula del endotelio vascular. La enzima antioxidante puede ser catalasa, superóxido dismutasa o glutathiona peroxidasa. La partícula además puede comprender un anticuerpo que específicamente se une a un antígeno en la superficie de la célula. De esta forma el anticuerpo puede utilizarse para facilitar la selección de la célula objetivo apropiada.

La administración de las partículas terapéuticas a un sujeto puede ser a través de infusión o inyección (intravenosamente, intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente, intrahecal, intraduodenalmente, intraperitonealmente, y similar). Las partículas también pueden administrarse intranasalmente, vaginalmente, rectalmente, bucalmente, oralmente o transdérmicamente. Preferiblemente, la composición se administra intravenosamente. La administración puede ser bajo la dirección de un médico. Las partículas pueden administrarse próxima o distalmente al dispositivo implantado.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas, trociscos o pastillas formuladas en una forma convencional. Las composiciones para

conocidos en la técnica, tales como mono-estearato de glicerilo, diestearato de glicerilo y cera.

Las partículas pueden aplicarse tópicamente. Tal administración incluye la aplicación de las partículas externamente a la epidermis, la cavidad de boca, el ojo, el oído y la nariz. Las partículas para uso en administración tópica incluye, por ejemplo, preparaciones en líquido o gel adecuadas para penetración a través de la piel tales como cremas, linimentos, lociones, ungüentos o pastas, y gotas adecuadas para suministrar al ojo, oído o nariz.

Se pueden utilizar varios sistemas de suministro de farmacéuticos alternativos. Los ejemplos no limitantes de tales sistemas incluyen liposomas y emulsiones. Ciertos solventes orgánicos tales como sulfóxido de dimetilo también pueden utilizarse. Adicionalmente, las partículas pueden suministrarse utilizando un sistema de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen los agentes terapéuticos. Los varios materiales de liberación sostenida disponibles son bien conocidos por el experto en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las partículas sobre un intervalo de varios días a varias semanas a varios meses.

Las partículas también pueden co-administrarse con otros agentes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan

calmantes del dolor, adelgazadores sanguíneos/anticoagulantes, reforzadores de coagulación, antiácidos estomacales o compuestos que disminuyen los efectos secundarios de las partículas.

La administración de estos compuestos adicionales puede ser simultánea con la administración de las partículas, o pueden administrarse en tándem, ya sea antes o después de la administración de las partículas, según sea necesario. Cualquier protocolo adecuado puede visualizarse por lo cual los varios compuestos pueden incluirse en el tratamiento de combinación y se administran en minutos, horas, días, o semanas entre sí. La administración repetida en un protocolo cíclico también se contempla como estando dentro del alcance de la presente invención.

Después de la administración de las partículas, la captura de las partículas terapéuticas a través del dispositivo implantado se efectúa durante un periodo de tiempo. La duración del suministro de las partículas magnéticas puede depender de cualquier número de variables, incluyendo sin limitación, las especies, raza, tamaño, altura, peso, edad, salud general del sujeto, el tipo de agente terapéutico, la composición de la partícula, el modo o forma de administración, o el tipo de severidad de la afección que se está tratando. La cantidad efectiva apropiada de las partículas para utilizarse rutinariamente se determina

la técnica. Preferiblemente, una dosis terapéuticamente efectiva de las partículas descritas en la presente proveerá un beneficio terapéutico sin causar una toxicidad sustancial al sujeto.

El régimen terapéutico de las partículas puede iniciarse con dosis más pequeñas de las partículas, seguido por un aumento en la dosificación durante el curso del tratamiento hasta que se obtenga el efecto óptimo bajo las circunstancias. Si es necesario, la dosificación diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día.

Para el tratamiento efectivo de una afección particular, un experto en la técnica puede recomendar un programa de dosis y una cantidad de dosis adecuada para el sujeto que se está tratando. Puede preferirse que la dosificación ocurra de una a cuatro o más veces diariamente mientras sea necesario. El programa de dosificación también puede variar dependiendo de la concentración del agente activo, que puede depender de las necesidades del sujeto.

Los métodos de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier afección que es adecuada para seleccionar terapéuticos. Los métodos son particularmente bien adecuados para tratar afecciones vasculares, incluyendo el seguimiento del cuidado para una angioplastia de endoprótesis metálico.

Se proveen los siguientes ejemplos para describir

### **Ejemplo 1**

#### **Preparación de Nanopartículas Estabilizadas No Magnéticas y Magnéticas, Compandidas de Sal Lípida Aniónica**

Para preparar nanopartículas a base de oleato cálcico no magnéticas, se formó oleato sódico disolviendo ácido oleico (100 mg) en 5 ml de solución acuosa conteniendo 14.8 mg de hidróxido de sodio con calentamiento ligero a 40°C. Se agregó solución de albúmina (10%, 0.4 ml) al oleato sódico acuoso. Se agregó por goteo solución acuosa de cloruro cálcico (111 mg en 5 ml) dando como resultado la formación de nanopartículas que exhiben una opalescencia azulada característica debido al efecto Tyndall. El tamaño de las nanopartículas fue de  $230 \pm 20$  nm según determinado por espectroscopia de correlación de fotón.

Las nanopartículas con base en oleato cálcico magnéticas se prepararon por medio de un procedimiento de dos pasos como sigue. Para preparar una suspensión acuosa estable se disolvieron óxido de hierro mixto (magnetita), cloruro férrico hexahidratado y cloruro ferroso tetrahidratado (100 mg y 50 mg, respectivamente) en 4 ml de agua desionizada y se precipitó por medio de 1.6 ml de hidróxido de sodio acuoso (1 M). Después se agregó oleato de sodio (150 mg en 5 ml de agua desionizada) al precipitado resultante. El precipitado de magnetita se volvió a suspender en la forma de nanocristales mediante calentamiento bajo argón a 90°C y la ultrasonificación

p/v) como un estabilizante a 1 ml de la solución de oleato de sodio obtenida conteniendo magnetita coloidal estabilizada con oleato, y las nanopartículas se formaron mediante la adición por goteo de cloruro cálcico (33.3 mM, 1.5 ml) después de ligera agitación. Las partículas se lavaron por sedimentación en un magneto y posteriormente se volvieron a suspender en agua. Las partículas también se pueden almacenar liofilizadas después del secado por congelamiento en 10% p/v de solución de trehalosa como un crio-protector.

La Figura 1A muestra que el tamaño de las nanopartículas resultantes puede ajustarse variando la concentración del estabilizador.

## **Ejemplo 2**

### **Incorporación de un Agente Lipófilo Neutral en las Nanopartículas Magnéticas**

Este ejemplo muestra la incorporación de un agente lipófilo neutral, tal como taxol, en las nanopartículas magnéticas, a través de la adición de su solución concentrada en un pequeño volumen de un solvente miscible en agua biocompatible, al ferro-fluido conteniendo el lípido aniónico y el estabilizador.

Las nanopartículas cargadas con taxol se prepararon como en el Ejemplo 1. Se agregó taxol, 1.0 mg en 10  $\mu$ l de dimetilformamida, al ferro-fluido conteniendo el lípido

El efecto de las nanopartículas magnéticas cargadas con taxol en comparación con una dosis equivalente de nanopartículas no conteniendo fármaco en la proliferación de células del músculo liso aórticas de rata cultivadas después de 15 min de incubación bajo un campo magnético (500 G) se determinó utilizando el ensayo Alamar Blue ( $\lambda_{\text{excitación}} = 540$  nm,  $\lambda_{\text{emisión}} = 575$  nm). Las células se sembraron en una placa de 96 cavidades a 10% de confluencia, y la proliferación celular se midió después de tres días como una función de la cantidad de la formulación de fármaco.

La Figura 2 muestra el efecto de las nanopartículas magnéticas cargadas con taxol en la proliferación de células del músculo liso aórticas de rata cultivadas como una función de la cantidad de nanopartículas. Como se puede ver de esta Figura, aunque las nanopartículas de control tienen un débil efecto estimulador en el crecimiento de las células de músculo liso, la proliferación de las células tratadas con nanopartículas de taxol se inhibió en una forma dependiente de la dosis y disminuyó en ~30% a la dosis más alta aplicada comparado con células no tratadas.

### **Ejemplo 3**

#### **Preparación de Nanopartículas Magnéticas Tratadas con Acido Retinoico Todo-Trans**

El método de formulación descrito anteriormente es

anticancerígeno, es un lípido aniónico que se forma en complejo fácilmente con calcio, y provee un ejemplo de una sustancia iónica que puede incorporarse en las nanopartículas.

Una formulación conteniendo atRA se preparó como se describe en el Ejemplo 2 con las siguientes modificaciones. La dispersión acuosa magnética se preparó en 4 ml de agua conteniendo 100 mg de oleato de sodio. El ácido retinoico todo-trans (50 mg) se disolvió en 1 ml de hidróxido de sodio acuosos (6.7 mg) y se agregó a la dispersión de magnetita antes de la adición por goteo de cloruro cálcico en la presencia de albúmina.

#### **Ejemplo 4**

##### **Preparación de Adenovirus conteniendo nanopartículas**

##### **Magnéticas**

Las nanopartículas magnéticas que encapsulan adenovirus pueden producirse mediante la adición de adenovirus antes del paso de la formación de la nanopartícula en la solución de oleato de sodio conteniendo ferro-fluido, o en la solución de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . En los siguientes ejemplos, se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de adenovirus ( $5 \times 10^{12}$  partículas por ml) que codifican el ferro-fluido para obtener la compresión del adenovirus en las partículas.

Las nanopartículas impregnadas con adenovirus se

de partículas virales por cavidad por 30 min con o sin un campo magnético. La expresión del gen se ensayó midiendo la fluorescencia GFP ( $\lambda_{\text{excitación}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisión}} = 535 \text{ nm}$ ) en las células 3 días después del tratamiento.

### **Ejemplo 5**

#### **Formación de Nanopartículas Magnéticas en la Presencia de un Péptido Catiónico**

Una mejora adicional en la eficiencia de la transducción puede obtenerse mediante la co-adición de uno o más péptidos o proteínas catiónicas, en particular polipéptidos y proteínas ricos en arginina, tal como poli-L-arginina o protamina, a solución de cloruro cálcico o cloruro de zinc. La modificación de la nanopartículas con estos péptidos y proteínas facilita la absorción celular y por consiguiente da como resultado una internalización más eficiente del adenovirus encapsulado con un aumento resultante en la expresión génica.

La incorporación de clorhidrato de poli-L-arginina (peso molecular  $\sim 70,000 \text{ Da}$ ) en las nanopartículas resulta en un aumento dependiente de la dosis en la transferencia génica adenoviral en células del músculo liso aórticas de rata cultivadas y células endoteliales aórticas de bovino.

Las células se sembraron en confluencia en placas de 96 cavidades y se trataron por 15 min en la presencia de

adición de 0-2.25 mg de clorhidrato de poli-L-arginina. La expresión del GFP se midió fluorométricamente en el día tres.

La Figura 3 muestra la expresión del transgen en células del músculo liso aórticas de rata cultivadas y células endoteliales aórticas de bovino (Figura 3A y Figura 3B, respectivamente) como una función de la cantidad de formulación de poli-L-arginina y la dosis de nanopartículas. La expresión del transgen en células endoteliales cultivadas con o sin exposición magnética se muestra en la Figura 3C. Los cinéticos de la expresión del transgen en células endoteliales cultivadas tratadas con nanopartículas modificadas con poli-L-arginina a una dosis equivalente a  $285 \times 10^5$  partículas virales por cavidad con o sin un campo magnético se muestran en la Figura 3D. En la ausencia de un campo magnético se observaron grados de transferencia génica sustancialmente inferiores como se muestra en la presente para las células endoteliales cultivadas (Figura 3C).

### **Ejemplo 6**

#### **Selección del Gradiente Magnético de las Nanopartículas**

Las nanopartículas magnéticas modificadas con albúmina con un marcador fluorescente rojo se inyectaron en la vena de la cola de una rata con un endoprótesis de Acero Inoxidable de Grado 304 de 6 mm de largo ya desplegado (Figura 6A). El Acero Inoxidable de Grado 304 ("acero 304")

contrató a una compañía de dispositivos médicos para fabricar un grupo de estos endoprótesis para utilizarse en los experimentos. De esta forma, todos los estudios reportados en la presente no utilizaron ninguno de las endoprótesis comercialmente utilizados actualmente.

El endoprótesis 304 en estos estudios en ratas se investigó tanto con como sin un campo magnético a través del endoprótesis. Además, las nanopartículas magnéticas sin un endoprótesis también se inyectaron en animales, con investigaciones para ver si había alguna localización que tomará lugar sin el despliegue del endoprótesis.

Métodos: Se dispersó Paclitaxel dentro de la matriz de ácido poliláctico (PLA) de nanopartículas cargadas con magnetita (MNP). Se prepararon MNP controlado con adenovirus utilizando activación de superficie fotoquímica con el posterior acoplamiento de una proteína de unión de adenovirus recombinante, D1, seguido por la formación de los complejos de nanopartícula-adenovirus. Los vectores de plásmido se asociaron en forma cargada con MNP funcionalizadas con PEI.

El atrapamiento magnético de las MNP en las mallas y las endoprótesis de acero bajo diferentes condiciones de potencia de campo y flujo se estudió en un sistema de flujo de circuito cerrado.

La transfección/transducción utilizando vectores

asociado con el gen reportero y células cargadas con MNP en endoprótesis desplegados y la expresión resultante del transgen se estudiaron en un modelo de endoprótesis de carótida de rata.

Protocolo (Figura 6A): Se inyectaron intravenosamente 400  $\mu$ l de nanopartículas cargadas con magnetita con base en ácido poliláctico, marcadas fluorescentes magnéticamente sensibles (a través de la vena de la cola) después de la inducción de anestesia en ratas de 480-510 g (ratas Sprague-Dawley (n=6)). Las nanopartículas cargadas con magnetita fueron de 350 nm, consistiendo de 7.2 mg por inyección. Esta inyección se llevo a cabo para saturar el sistema reticuloendotelial del animal para prevenir una captura excesiva de la segunda dosis principal de nanopartículas en el hígado y el bazo.

Dentro de los 30 minutos de la primera inyección, se desplegó un endoprótesis de acero 304 en la arteria carótida común izquierda. Inmediatamente después de esto, se inyectó otra dosis de 400  $\mu$ l de nanopartículas, ya sea con o sin el campo magnético 300 G creado por 2 electromagnetos colocados adyacentes al cuello del animal. El campo se mantuvo durante 5 min después de la inyección, después de lo cual las arterias se recolectaron. Los endoprótesis se removieron y la deposición de las nanopartículas en las endoprótesis y los aspectos luminosos de las arterias se

concentración se determinó fluorométricamente contra una curva de calibración. Para propósitos de control/fondo de fluorescencia en una rata adicional, no se inyectaron nanopartículas y las arterias con el endoprótesis se removieron y se procesaron similarmente para obtener valores de fluorescencia de fondo.

Resultados: El un sistema flujo de circuito cerrado, las MNP y las células se cargaron con MNP atrapado en mallas magnéticas con cinéticos exponenciales. Las SMC aórticas de rata (A10) cultivadas en rejillas de acero inoxidable 316L mostraron un aumento de 100 veces en la transducción génica cuando se expusieron a las MNP-Ad<sub>GFP</sub> comparado con los controles. Las MNP de Paclitaxel demostró la inhibición del crecimiento de células A10 en cultivo. La inyección intravenosa sistémica en las ratas de las MNP dio como resultado una localización 7 veces mayor de las MNP en endoprótesis intra-arteriales comparado con controles cuando se llevaron a cabo en la presencia del campo magnético externo (300-G).

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 6B (fluorimetría, 540/575 nm), así como con microscopía de fluorescencia (no mostradas), demostrando la intensa localización de nanopartículas magnéticas para el endoprótesis 304 desplegado, y también la localización de nanopartículas magnéticas para la pared arterial directamente

inyección intravenosa utilizando esta metodología.

Conclusión: El suministro de fármaco/gen magnéticamente seleccionado utilizando gradiente de altos campos magnéticos para arterias canuladas ofrece una gran promesa debido al potencial no solamente de la dosificación inicial, sino de la administración repetida utilizando la localización mediada por campo magnético de vectores para la pared arterial canulada. Estos resultados claramente demuestran una significativamente mayor deposición de nanopartículas y en endoprótesis y tejido arterial adyacente en el grupo en donde se llevó a cabo el suministro intravenoso sistémico junto con un campo electromagnético comparado con controles "sin campo". Las arterias no canuladas no mostraron la localización de las nanopartículas con o sin un campo magnético.

### **Ejemplo 7**

#### **Atrapamiento y Remoción Magnética de Nanopartículas y Células Residuales**

Este Ejemplo ilustra la remoción de nanopartículas y células residuales con un filtro de acero magnéticamente sensible externo ("trampa magnética"). La Figura 7 ilustra un sistema de flujo 400 que esquemáticamente resumen el sistema de recuperación 108 (Figura 4) que se utiliza para modelar la recuperación de las nanopartículas o células magnéticas de la

nanopartículas residuales), electromagnetos 404 para generar un campo magnético, una bomba peristáltica 406, un agitador 408, y grifos 410 para dirigir el flujo al ciclo A o ciclo B. Una bomba peristáltica 406, un agitador 408, y grifos 410, comunes para un aparato para la aféresis, se entenderán por el experto en la técnica a partir de la descripción de la presente.

Se utilizaron los siguientes protocolos experimentales para determinar los cinéticos de captura de las nanopartículas y células magnéticas, respectivamente, utilizando el aparato "Trampa Magnética".

Las nanopartículas magnéticas con base en PLA-PEG se diluyeron en 50 ml de 5% de solución de glucosa y filtraron (5  $\mu$ m de recorte) para asegurar un tamaño de partícula uniforme. Alternativamente, las células endoteliales aórticas de bovino (BAEC, por sus siglas en inglés) se cultivaron a confluencia y se incubaron con nanopartículas magnéticas fluorescentemente marcadas en un magneto de cultivo celular (Dexter Magnet Technologies, Elk Grove Village, IL) produciendo un fuerte campo magnético (500 Gauss) por 24 horas, seguido por lavado y resuspensión de células en medio del cultivo celular fresco. Las células se utilizaron como un control.

El sistema de flujo 400 se purgó con 5% de glucosa o medio de cultivo, respectivamente, (paso de lavado) seguido

Después, la suspensión de nanopartículas/células se redirigió al circuito B incluyendo el dispositivo de trampa 402 equipado con de una a tres piezas de mallas de acero inoxidable 430 (peso total de  $0.30 \pm 0.01$  y  $0.83 \pm 0.05$  g, respectivamente) y un campo magnético externo de 800 Gauss generado por dos electromagnetos solenoides 404. Se extrajo una muestra  $t_0$  y además se utilizó como una referencia (100% de NP/células). Las muestras adicionales se recolectaron en puntos en el tiempo predeterminados durante 2.5 horas y 35 min en los experimentos de recuperación de nanopartículas y células, respectivamente. El efecto de la exposición al campo magnético se investigó en comparación con condiciones "sin campo" empleadas durante los primeros 25 y a 3 minutos en el experimento para las nanopartículas y células, respectivamente, después de lo cual se aplicó el campo. Una fracción de NP/célula aún en circulación en un punto en el tiempo dado se determinó fluorométricamente ( $\lambda_{ex} = 540$  nm,  $\lambda_{em}$  - 575 nm) con relación a la muestra de referencia. Las muestras de malla fueron visualizadas bajo el microscopio fluorescente utilizando el filtro fluorescente rojo establecido (540/575 nm) inmediatamente y 24 horas después de completar el experimento. Las células recolectadas se incubaron durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  y se examinó su morfología microscópicamente.

La Figura 8 y la Figura 9 describen los cinéticos de depleción exponenciales de nanopartículas y células BAEC.

significativamente menos pronunciada en ambas las nanopartículas y las células BAEC en condiciones "sin campo". Bajo la exposición al campo magnético, los cinéticos de depleción de ambas nanopartículas y células fue muy rápida con  $t_{90\%}$  (es decir, el tiempo requerido para eliminar 90% de las nanopartículas o células en circulación) igualando 75 min y 16 min para nanopartículas y células, respectivamente. El  $t_{90\%}$  cinco veces inferior para la captura de células aparentemente se debe a su sensibilidad magnética superior debido a que las células contienen un gran número de nanopartículas/células comparadas con las NP de tamaño menor.

Haciendo referencia a la Figura 10, se muestran diferentes configuraciones de trampas magnéticas y cinéticos de depleción correspondientes. Al aumentar la cantidad y área de superficie del acero inoxidable 430 en la "Trampa Magnética" de 0.3 a 0.83 g, causó una reducción significativa en  $t_{1/2}$  en circulación de las nanopartículas (27 frente a 50 min). De esta forma la optimización del diseño de la "Trampa Magnética" podría permitir potencialmente cinéticos de recuperación de nanopartículas y células lo suficientemente rápido para su uso clínico. La diseminación de las células también se demostró cuando las células se removieron de la circulación para la medición de la depleción celular. Las células se cultivaron durante la noche en la placa de cultivo celular a 37°C y en la atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las micrografías de la malla tomadas después del experimento

Las células magnéticamente sensibles capturadas al final de experimento y la diseminación de las células 24 horas después, también se demostraron. Las células muestreadas de la circulación durante el experimento de captura de células demostraron características de morfología normales de BAEC. Las condiciones de cultivo son 10% de DMEM suplementado con FBS a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las mallas utilizadas en la trampa magnética en este experimento se visualizaron bajo el microscopio fluorescente inmediatamente y 24 horas después del experimento con el fin de evaluar la morfología de las células capturadas. Se muestra que se capturó un gran número de células inicialmente por los bordes de la malla, de la cuales las localizadas más adyacentes a la superficie de la malla forman una capa de células uniformemente diseminadas después de 24 horas sobre la expansión de la superficie completa de la estructura de la malla, de esta forma mostrando la viabilidad de las células magnéticamente seleccionadas. La captura de las nanopartículas portadoras magnéticas al final de experimento se demostró en la superficie de la malla de acero inoxidable 430 bajo el campo de 800 Gauss ("La Trampa Magnética"), cuando se compara con una malla de control al inicio del experimento antes de la aplicación del campo magnético.

### **Ejemplo 8**

#### **TEM y Curva de Magnetización de Nanopartículas Magnéticas**

se muestran los resultados de la microscopía de electrón de transmisión y una curva de magnetización (momento magnético contra campo magnético), respectivamente para nanopartículas magnéticas estabilizadas con albúmina (MNP), descritas anteriormente con respecto al Ejemplo 6. Observar el pequeño tamaño y el gran número de granos de magnetita recubiertos con ácido oleico individuales distribuidos en la matriz polimérica de las MNP (Figura 11A). Las MNP exhiben un comportamiento superparamagnético, no mostrando una histéresis significativa, y una magnetización remanente en el orden de 0.5% del valor de magnetización de saturación respectivo. (Figura 11B).

### **Ejemplo 9**

#### **Carga de células de MNP**

Haciendo referencia ahora a las Figuras 12A-12B, se ilustran los estudios de carga celular de las MNP *in vitro*. En particular la Figura 12A ilustra los cinéticos de la absorción de las MNP por medio de células endoteliales aórticas de bovino (BAEC) como una función de las dosis de MNP y el tiempo de incubación; la Figura 12B ilustra la viabilidad celular como una función de las dosis de MNP y tiempo de incubación; también se ilustra una curva de magnetización de células cargadas con MNP demostrando un comportamiento superparamagnético como se observó con las MNP *per se*. La absorción de las nanopartículas se determinó por

Se incubaron las BAEC (células endoteliales aórticas de bovino) con varias dosis de MNP en un magneto. Como se muestra en la Figura 12A, la absorción de las MNP se determinó a diferentes puntos en el tiempo por fluorescencia de nanopartículas internalizadas. La cantidad de MNP internalizadas fue casi lineal dependiente de la dosis de nanopartículas. Aproximadamente el 30% de la internalización se observó después de 8 horas y la absorción se completó prácticamente después de 24 horas, mientras que no se obtuvo una absorción significativa en la ausencia de un campo magnético a 24 hr. Como se muestra en la Figura 12B, la viabilidad celular a diferentes condiciones experimentales (tiempo de incubación y dosis de MNP) no se vio adversamente afectada por la carga de MNP. Se observó más de 85% de supervivencia celular en todas las dosis de MNP estudiadas y tiempos de incubación relativamente a las células sin tratar. La curva de magnetización de las células cargadas con MNP demuestra un comportamiento superparamagnético que no muestra una histéresis significativa y una magnetización remanente en el orden de 0.5% del valor de magnetización de saturación respectivo.

### **Ejemplo 10**

#### **Eficiencia de la Transferencia Génica y la Toxicidad Celular**

Las partículas se estudiaron para la transfección de células en cultivo. Se prepararon tres clases de

todos los experimentos, las nanopartículas se agruparon en complejos con 0.25 µg de plásmido de ADN que codifica GFP por cavidad en 5% de glucosa por 30 min, después de mezclaron 1:4 con medio de cultivo celular suplementado con 10% de suero de bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) y se aplicaron a las células por 10 min con el campo magnético. Su eficiencia en la transfección, así como la absorción y toxicidad de las nanopartículas, se estudió en células de músculo liso aórtico de rata cultivadas y células endoteliales aórticas de bovino (A10 y BAEC, respectivamente) utilizando partículas no magnéticas como un control. La expresión génica, la absorción de NP y la supervivencia de las células se determinó midiendo la fluorescencia a 485/535 nm, 620/670 nm y con el ensayo Alamar Blue (540/575 nm), respectivamente, en el punto en el tiempo del día 2. Los resultados se presentan en la Figura 13A-13F.

Las formulaciones magnéticamente sensibles resultaron en altos niveles del producto génico según opuesto a las nanopartículas no magnéticas (Figuras 13A-13F) en correlación con su absorción celular (Figuras 13C y 13D). Todas las formulaciones exhibieron baja toxicidad en el cultivo celular en el intervalo en cantidad examinado (Figuras 13E y 13F).

En otro experimento, las células endoteliales aórticas de bovino (BAEC) se sembraron en el día 1 (2 X

siglas en inglés) en el día 0 antes de la transfección. El ADN de plásmido se incubó por 30 minutos con nanopartículas magnéticas (los miembros del complejo) a varias proporciones en 5% p/v de solución de glucosa, serialmente diluido 1.25 veces con FBS conteniendo DMEM para proveer una concentración sérica final de 10% u 80% y aplicado a las células a 0.25 Mg de ADN/cavidad. Las células se incubaron a 37°C, mientras una placa se colocó cada vez en el magneto (15 min), y otra se mantuvo a distancia de ésta. El medio después de remplazó con DMEM pre-calentado fresco suplementado con 10% FBS. Las células se observaron para la transfección después de 24 hr.

Las nanopartículas y PEI mostraron la transfección comparable de células BAEC en cultivo con ADN codificando para proteína fluorescente verde cuando se aplicaron sin el uso de un campo magnético externo, a pesar de que la eficacia en la transfección de las nanopartículas magnéticas en la presencia de un magneto permanente aumento sustancialmente cuando se compara con ambas, las formulaciones de control y las nanopartículas magnéticas aplicadas en la ausencia del magneto.

También se observó un efecto similar del campo magnético en la eficacia de la transfección en células A10 en cultivo.

Notablemente las NP magnéticas fueron capaces de efectivamente transfectar las células en la presencia de 10% y 80% de suero aparentemente debido a su efecto protector contra

ADN:PEI a las células en la presencia de suero durante el mismo período de tiempo.

### **Ejemplo 11**

#### **Selección Magnética de Nanopartículas Conteniendo ARNsi**

Las nanopartículas magnéticas se formularon utilizando el siguiente protocolo: se mezclaron rápidamente 5.5 ml de una solución acuosa conteniendo 300 mg de  $\text{FeCl}_3$  hexahidratado y 150 mg de  $\text{FeCl}_2$  tetrahidratado con 4.75 ml solución acuosa de NaOH (1.0 M). El precipitado obtenido se separó en un magneto. Se agregó por goteo ácido oleico (150 mg), el precipitado se suspensión en 2 ml de etanol, y la mezcla se desgaseó en argón. El contenido se calentó a  $90^\circ\text{C}$  en un baño de agua por 5 min con varias agitaciones. Se agregaron por goteo 4 ml de agua con agitación ligera, el óxido de hierro cubierto con ácido oleico se precipitó en un magneto, y la fase líquida se aspiró cuidadosamente. El precipitado se lavó con 4 ml de etanol para eliminar el ácido oleico en exceso; se aspiró etanol después de la sedimentación en un magneto. El precipitado se volvió a suspender en 5 ml de cloroformo.

Una fase orgánica consistiendo de 200 mg de ácido poliláctico (PLA) (D,L-PLA 70-120 K Sigma), 100 mg de polietilenimina (PEI) (PEI ramificado, Aldrich 25 K) o 200 mg de PEI lineal 200K (pH 7) y 100 mg de ácido oleico disueltos en la suspensión clorofórmica de magnetita se agregaron a 15 ml de

se dializó contras agua desionizada a 4°C por 24 hr con varios reemplazos de agua utilizando una membrana de diálisis de recorte de 300,000 Da. Se agregó trehalosa (10% p/v) a la suspensión de nanopartículas obtenida, y las nanopartículas se liofilizaron y almacenaron a -20°C.

La formulación de NP (Figura 14) utilizada en el presente ejemplo, diámetro de 360 nm, exhibió comportamiento superparamagnético no mostrando histéresis significativa, y una magnetización remanente en el orden de 0.5% de los valores de magnetización de saturación respectivos. El momento magnético depende del campo magnético casi lineal de hasta 1000 Oe obteniendo 66-68% del valor de saturación, a pesar de que se observó un aumento comparativamente bajo en la magnetización después de un aumento más del campo a 5000 Oe (Figura 14). La susceptibilidad magnética específica de las NP se encontró como siendo de alrededor de  $5.03 + 0.04 \text{ emu/cm}^3 \times \text{kOe}$ .

El PEI lineal se preparó como se describe en: Thomas, M y otros (2005). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5679-84. En resumen, se preparó PEI lineal 200K completamente desacilado de poli(2-etil-2-oxazolina) 200K PEOZ comercialmente disponible (Sigma-Aldrich). Típicamente, se agregaron 3.0 g de PEOZ a 120 ml de 24% (p/v) de HCl, seguido por reflujo por 96 h. La primera mezcla de reacción contuvo un precipitado blanco en toda la reacción. Los cristales PEOZ se disolvieron completamente en ~2hr, se lavaron una vez con 2-propanol. El polvo se redispersó

completamente desacilado exhibió un singlete a 3.57 ppm por NMR correspondiendo a  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \quad \text{H}_2^+$  pero ninguna señal correspondientes a las fracciones de N-propionilo, confirmando la remoción de su complejo.

La supresión de la expresión del eGFP en células de músculo liso transducidas con lentivirus por ARNsi utilizando NP magnéticas se obtuvo en el siguiente experimento: se cultivaron células de músculo liso aórticas de rata (A10) por varios pasajes después de la transducción con GFP que codifica lentivirus. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con  $10^5$  de suero de bovino fetal (FBS). Las NP liofilizadas se volvieron a suspender en 100  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y diluidas serialmente por triplicado para obtener el siguiente intervalo de cantidad de NP: 0-14  $\mu\text{g}$  y 2.2  $\mu\text{g}$  para PEI-NP ramificado y lineal por cavidad (formato de placa de 96-cavidades) respectivamente. El ARNsi se incubó por 30 min con NP a varias proporciones en 5% p/v de solución de glucosa y se agregó a las células después de una dilución de 5 veces con DMEM suplementado con suero a 0.15, 0.25, y 0.35  $\mu\text{g}$  de ARN/cavidad seguido por 20 min de exposición al campo magnético (500 Gauss producido por un magneto de cultivo celular, Dexter Magnet Technologies, Elk Grove Village, IL). Las mediciones fluorométricas de la expresión de GFP ( $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}/535 \text{ nm}$ ) y la viabilidad celular (ensayo Alamar Blue [Biosource, Camarillo, CA USA], ( $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}/575 \text{ nm}$ ) se realizaron en células vivas 5 días después del tratamiento.

(Figura 14). Para ambos tipos de formulaciones la supresión del eGFP dependió directamente de la dosis de NP, alcanzando un máximo de 20-40% (Figura 14). Sin embargo, la supresión de eGFP obtenida utilizando la formulación de PEI lineal exhibió una saturación con la dosis de NP en aumento, a pesar de que para la formulación de PEI-NP ramificadas la supresión de eGFP exhibió una dependencia de dosis casi lineal en el intervalo de NP estudiado completo. La supresión de eGFP fue directamente dependiente de la dosis de ARNsi en el caso de la formulación lineal PEI e inversamente dependiente para la formulación PEI-NP ramificada dando como resultado una supresión máxima de 38 y 40% para formulaciones de PEI lineales y ramificadas a una dosis de 0.35 y 0.15 g de ARNsi, respectivamente (Figura 14A y 14C). Las formulaciones de NP/ARNsi no comprometieron significativamente la supervivencia de la célula mostrando más de 90% de células viables 5 días después del tratamiento a dosis máximas de NP (Figura 14B y 14D).

## **Ejemplo 12**

### **Selección de Gradiente de Alto Campo de Células Endoteliales Cargadas con Nanopartículas Magnéticas en la Superficie de Endoprótesis de Acero**

Formulación y Caracterización de Nanopartículas. La magnetita preparada de cloruro férrico y ferroso (300 mg y 150 mg, respectivamente) por precipitación alcalina con hidróxido de sodio acuoso se separó magnéticamente, se volvió

agua por 5 min. El exceso de ácido oleico se separó en fases por la adición por goteo de 4 ml de agua y la magnetita cubierta con lípido se lavó dos veces con etanol. La magnetita lipófila se dispersó en 6 ml de cloroformo, formando un ferro-fluido estable. La dispersión orgánica resultante de óxido de hierro se utilizó para disolver el PLA, de esta manera formando una fase orgánica. La fase orgánica se emulsionó en una solución acuosa de albúmina (1%) por sonicación en un baño helado seguido por la evaporación del solvente orgánico. Las partículas se separaron de la albúmina unidad por ciclos de sedimentación/re-suspensión magnéticos repetidos, y se liofilizó con 10% (p/v) de glucosa como un crio-protector. Las MNP liofilizadas se mantuvieron a -20 °C y volvieron a suspender en agua desionizada antes del uso.

Las mediciones del tamaño de partícula se llevaron a cabo utilizando el Analizador de Tamaño de Partícula 90 Plus (Brookhaven Instruments, Holtville, NY USA). Las propiedades magnéticas de las MNP y las células cargadas con MNP se estimaron de las curvas de histéresis ya sea de muestras de 5 µl de MNP o células cargadas con MNP secadas a aire en portaobjetos con cubierta de vidrio de 4 x 4 mm<sup>2</sup> utilizando un magnetómetro de gradiente alternativo (Princeton Instruments Corporation, Princeton, NJ, USA).

Preparación Celular. Las células endoteliales

bovino fetal (FBS) para los experimentos de carga celular y viabilidad celular. Para sincronizar los cultivos celulares con respecto a la absorción de MNP, las células se incubaron a 4°C por 30 min. Después se agregaron las MNP a las células a diferentes dosis y los cultivos se incubaron en un separador magnético adaptado para placas de cultivo celular utilizando una fuente de campo magnético de 500 Gauss (LifeSep™ 96F, Dexter Magnetic Technologies, Fremont, CA, USA).

Además, en puntos en el tiempo predeterminados las células se lavaron con salina amortiguada en pH con fosfato y la cantidad de MNP internalizada se midió fluorométricamente ( $\lambda_{em}/\lambda_{ex}$  = 540/575 nm).

La viabilidad celular se determinó en todos los puntos en el tiempo utilizando tinción verde de calceína y el ensayo AlamarBlue como se describe por el fabricante (Biosource, Camarillo, CA USA).

Para los estudios de captura celular *in vitro* en endoprótesis, se sembró BAEC en placas de 12 cavidades de fondo transparente. El día siguiente se agregaron 72 µg de MNP a cada cavidad de células  $(4.5 \pm 1.0) \times 10^4$ . Las células y las MNP se incubaron en una fuente magnética (Life Sep™ 96F) por 24 h para permitir la internalización casi completa (~95%) de las MNP. Después, las células se tripsinizaron y volvieron a suspender en un medio de cultivo celular para

transdujeron con adenovirus de replicación defectuosa de tipo 5 (E1, E3 eliminados) expresando luciferasa (Ad luc) bajo el control del promotor de citomegalovirus humano (Gene Vector Core, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) por 10 horas (MOI=500) y después cargadas con MNP por 24 horas.

Experimentos *In Vitro* e *In Vivo* de Captura Celular a Corto Plazo. En un experimento de captura celular *in vitro*, BAEC cargado con MNP (aprox.  $2.5 \times 10^6$ ) circularon en un sistema de ciclo cerrado a una velocidad de flujo de 30 ml/min (0.015 m/s velocidad del fluido a través de la superficie del endoprótesis) a pesar de que se aplicó un campo magnético homogéneo de 1000 Gauss. Se produjo un campo magnético homogéneo al pasar una corriente eléctrica a través de bobinas de solenoide serialmente conectadas con centros de hierro (40 mm en diámetro) colocados en ambos costados de ya sea un endoprótesis colocado en una cámara de flujo de un modelo de sistema circulatorio de ciclo o un animal canulado dentro de una distancia de 40 mm entre los centros de los electromagnetos. Se generó una corriente eléctrica de 9.4A por un suministro de energía HP 6034A (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) por la aplicación de un voltaje de 28V. La potencia del campo magnético se midió por una Sonda Hall comprada de Lake Shore Cryotronics (Westerville, OH). La depleción celular se monitoreó midiendo la fluorescencia de las MNP y los resultados se presentan como un porcentaje de células capturadas.

en arterias carótidas de rata. Para estudios preciosos, se inyectaron células BAEC precargadas con MNP fluorescentes en la cavidad ventricular izquierda. Los animales se expusieron a un campo magnético de 1000 Gauss por 5 minutos, utilizando el sistema descrito anteriormente, incluyendo el período de inyección. Las ratas de control experimentaron un procedimiento idéntico, en donde no se usó un campo magnético. Los animales se sacrificaron 5 min después del suministro, y las endoprótesis explantados se examinaron por microscopía fluorescente.

Angioplastia y Procedimiento de Suministro *In Vivo*: Estudios de 48 horas. Las carótidas comunes izquierdas de ratas macho Sprague-Dawley de 450-500 g se lesionaron por 4 pasajes de un catéter Fogarty antes del despliegue (16 atm) del endoprótesis multi-vínculo hecho de acero inoxidable de grado 304 (Circle Medical Devices, Los Gatos, CA). En los estudios modelo del suministro celular bajo condiciones de detención de flujo, se introdujo una tubería de 23 G a través de la carótida externa en la arteria carótida común y se colocó distal al endoprótesis desplegado. De esta forma, para estos estudios con interrupción temporal del flujo sanguíneo de la carótida, un segmento de 15 mm de la arteria carótida común abarcando el sitio canulado se aisló con ligaduras. La suspensión celular (50  $\mu$ l) se suministró dentro del segmento arteria aislado por 15 segundos, después de los cual el exceso de células que no se retuvieron en la arteria se

una tubería de 26 G a través de la carótida externa en la carótida común y se hizo avanzar más allá del endoprótesis hacia el arco aórtico (total 3.5 cm próximo de la bifurcación de la carótida). Las células se inyectaron a una velocidad de 1 ml /min durante un minuto. Para ambos protocolos de suministro, en el grupo Mag+ la inyección se llevó a cabo con animales colocados en un campo magnético de 1000 Gauss, como se describe anteriormente, y el campo se mantuvo por un total de 5 minutos después del suministro. En ratas de control (grupo Mag-) no se aplicó un campo magnético. Se tomaron las imágenes de los animales después del suministro mediante administración perivascular local de 2.5 mg de luciferina mezclada en 250  $\mu$ l de 25% de Plurónico F127 disuelto en PBS.

Esta formulación experimenta la transición de fase entre la solución y el gel a temperaturas mayores de 30°C y de esta forma, se solidifica inmediatamente después del contacto con el tejido, formando un depósito de fármaco con cinéticos de liberación rápida bien definidos (24). La formación de imágenes se inició 5 minutos después del suministro. El tiempo de integración fue de 10 min. Para la detección inmunohistoquímica de luciferasa, las secciones arteriales crio-embebidas con paraformaldehído se tiñeron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-luciferasa (Upstate-Millipore, Temacula, CA, clon mAb21, 1:100) utilizando un método de peroxidasa/DAB.

de regresión. Se utilizó la prueba t de Student para analizar la importancia de las diferencias en los grupos de datos. Las diferencias se denominaron significantes a  $p < 0.05$ .

Resultados. Se prepararon MNP de poliláctica mediante metodología de evaporación de solvente por emulsión modificada con la incorporación de nanocristales de óxido de hierro cubiertos con hierro (Quintanar-Guerrero D y otros (1998) Drug Dev. Ind. Pharm. 24: 1113-28) utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como un agente estabilizar de superficie. Las MNP estabilizadas con albúmina desplegaron una distribución de tamaño estrecha con un diámetro promedio de  $290 \pm 15$  nm (Figura 11A) y exhibieron un comportamiento superparamagnético sin mostrar histéresis significativa, y una magnetización remanente en el orden de 0.5% del valor de magnetización de saturación. El material de endoprótesis utilizado fue acero inoxidable de grado 304, que se seleccionó por su combinación de propiedades magnéticas adecuadas y su resistencia a la corrosión en entornos acuosos. Los endoprótesis 304 también exhibieron un comportamiento casi superparamagnético mostrando solamente una ligera histéresis magnética y desplegando una magnetización remanente en el orden de 7% del valor de magnetización de saturación (Figura 15A). Los endoprótesis de acero inoxidable 316L también se probaron pero no se incluyeron en los estudios seleccionados debido a sus bajas propiedades magnéticas sensibles (Figura 15A).

90

564/570 por lo tanto dando como resultado MNP que podrían utilizarse en experimentos de microscopía fluorescente y estudios de cuantificación con base en la fluorometría (Chorny M y otros (2006) Mol. Ther. 14: 382-91). Esta formulación se utilizó para caracterizar los cinéticos de células cargadas con MNP. Se incubaron células aórticas de bovino (BAEC) en cultivos de células confluentes con varias dosis de BODIPY 564/570-MNP en un magneto de cultivo celular (ver Materiales y Métodos). La absorción de las MNP se determinó a diferentes puntos en el tiempo midiendo la fluorescencia de las nanopartículas internalizadas. La cantidad de MNP internalizadas dependió linealmente de la dosis de MNP en el intervalo ensayado (Figura 12A). Se observó aproximadamente 30% de internalización después de 8 horas y la absorción se completó esencialmente después de 24 horas (Figuras 12A y 15B). La viabilidad celular no se vio adversamente afectada por las MNP internalizadas, según evaluado por los resultados de tinción con Verde Calceína y los ensayos Alamar Blue (Figura 15B y 12B respectivamente). La supervivencia celular de  $83 \pm 3\%$  con relación a células no tratadas se observó a la dosis más alta de MNP aplicada, 9  $\mu\text{g}/\text{cavidad}$  (correspondiente a una carga de MNP de 0.3  $\text{ng}/\text{célula}$ ), y en el tiempo de incubación máximo de 24 horas (Figura 12B). Con base en estos resultados, una dosis de MNP de 0.2  $\text{ng}/\text{célula}$  se seleccionó para los experimentos posteriores ( $92 \pm 2\%$  de supervivencia celular, a una dosis de

mostrando propiedades histeréticas similares al MNP libre (sin células asociadas) (es decir, una magnetización remanente de menos de 1% del valor de saturación) (Figura 15A).

Las células endoteliales cargadas con MNP seleccionadas para endoprótesis de grado 304 de acero inoxidable primero se estudiaron en un modelo del sistema de ciclo de flujo. En la ausencia de un campo magnético uniforme externamente aplicado, casi no se observó captura celular (Figura 16A). Sin embargo cuando se aplica un campo magnético uniforme a través del endoprótesis dentro del sistema de ciclo de flujo, el endoprótesis capturó un porcentaje significativo de las células en circulación, demostrando una velocidad inicial de 1% de células capturadas por minuto (Figura 16A). La saturación en la captura celular se observó dentro de 50 min después de aplicar el campo magnético, resultando en la selección de 20% de células en circulación (aprox.  $0.5 \times 10^6$ ). Aproximadamente 50% de las células capturadas (aprox.  $0.25 \times 10^6$ ) se acumularon en la superficie del endoprótesis dentro los primeros 6 minutos. La Figura 16B muestra la superficie del endoprótesis al final de experimento con células adherentes completamente cubriendo la superficies cableadas del endoprótesis, como se demuestra por los resultados de la microscopía de fluorescencia MNP roja y la tinción con Verde de calceína indicando la viabilidad de las células capturadas (Figura 16C).

transtorácica de BAEC cargadas con MNP en la cavidad ventricular izquierda en la presencia de un campo magnético uniforme (1000 Gauss) a través de la región de la arteria canulada (Figuras 16D y 16E). Los animales se sacrificaron 5 minutos después de la selección magnética, y las endoprótesis recuperados, revelaron la selección de MNP para superficies de endoprótesis de grado 304 de acero inoxidable en la presencia de un campo magnético (Figura 16D), de nuevo con una cobertura uniforme completa de los cables del endoprótesis con células conteniendo MNP fluorescentes. Sin embargo, en la ausencia de un campo magnético, se demostraron BAEC cargadas con MNP detectable (Figura 16E). De esta forma, estos resultados *in vivo* de corto plazo fueron comparables con los estudios de selección *in vitro* (Figura 16B).

Los experimentos utilizando BAEC tanto cargadas con MNP como transducidas con luciferasa que codifica adenovirus defectuosos de replicación (AdLuc) se llevaron a cabo enseguida. Los estudios iniciales examinaron la selección magnética de BAEC modificadas con Luc cargada con MNP con el suministro local en una configuración con detención de flujo (Figura 16F), utilizando la actividad del transgen Luc como un punto final, detectado con formación de imágenes bioluminiscentes intra-vitales (Figura 16F). Después de la transducción AdLuc *in vitro* y la precarga con MNP, las BAEC se cosechó y suministró localmente a un segmento canulado aislado de cada arteria carótida de rata en la presencia o

de detención de flujo) a pesar de que las BAEC cargadas con MNP se suministraron a la sección canulada durante un breve período de aproximadamente 15 segundos (Figura 16F). La suspensión celular después se evacuó de la arteria, y el campo magnético se mantuvo durante 5 minutos más antes de dejar que se resumiera la circulación. Los animales se recuperaron y estudiaron 48 horas después, y como se esperaba, se demostró una significativamente mayor expresión del transgen ( $p=0.045$ ) utilizando administración de luciferina perivascular local seguido por formación de imágenes ópticas *in vivo* bioluminiscentes, en animales que se habían administrado con BAEC cargadas con MNP en la presencia de un campo magnético uniforme comparado con un grupo de control no sometido a condiciones de suministro magnético (Figura 16F). También es notable que las exploraciones de imágenes del cuerpo entero bioluminiscentes de los animales en estos estudios revelaron una ausencia de la actividad del transgen excepto dentro de los segmentos de la carótida canulados (datos no mostrados).

El suministro magnéticamente seleccionado de BAEC cargadas con MNP sin interrupción del flujo sanguíneo de la carótida canulada también se investigó mediante la inyección de BAEC cargadas con MNP que expresan Lux sobre el curso de 1 minuto a través de un catéter colocado en el arco aórtico con exposición a un campo *magnético* uniforme por 5 minutos (Figura 16G). La selección específica para las endoprótesis desplegadas debido al

actividad de Luc detectable presente en los segmentos arteriales canulados que no se expusieron a un campo magnético ( $p=0.005$ ).

Además, hubo la ausencia de bioluminiscencia en los sitios distales (datos no mostrados) en estos estudios también. La inmuno-tinción Luc-positiva confirmó la presencia de la actividad del transgen en las regiones íntima y media de los segmentos de arterias canuladas que se expusieron a selección magnética celular (datos no mostrados).

### **Ejemplo 13**

#### **Uso de un Campo Magnético Homogéneo para Seleccionar Células Cargadas con Nanopartículas Magnéticas para un Stent 316L**

Se llevó a cabo un experimento modelo para demostrar la factibilidad de la selección de células cargadas con nanopartículas magnéticas (MNP) para endoprótesis de acero utilizando el campo magnético homogéneo presente en un sistema explorador de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés). El campo presente en el formador de imágenes, 1.5 Tesla (T) es 15 veces mayor que los campos más altos utilizados en otros estudios (1000 Gauss, o 0.1 Tesla). Además, los estudios anteriores utilizaron endoprótesis de acero 304 que se magnetizaron en un campo Tesla de 0.1, a pesar de las endoprótesis de acero 316L no se magnetizaron a este nivel de potencia de campo. Además, se debe observar que la mayor parte de las endoprótesis de acero utilizadas hoy

El experimento se llevó a cabo como sigue: Las células endoteliales arteriales de bovino (BAEC) se pre-cargaron con MNP de ácido poliláctico fluorescente rojo (PLA) preparado como se describe anteriormente en el día -1. Las células se tripsinizaron, se volvieron a suspender en 5 ml de medio de cultivo celular (DMEM suplementado con 10% de FBS) antes del experimento, y se dividieron en dos mitades. Las endoprótesis de grado 316 de acero inoxidable (Crown, Cordis, Warrenton, NJ) se desplegaron en tubos de cloruro de polivinilo flexibles, para simular el despliegue arterial, acoplados a las jeringas. La suspensión celular se extruyó de la jeringa a través del tubo con la endoprótesis dentro la misma durante un período de 1 minuto (recolectando la suspensión celular en la segunda jeringa) con o sin una exposición a un campo magnético homogéneo (1.5 Tesla) dentro del centro del formador de imágenes MRI. Las endoprótesis se exploraron por microscopia fluorescente utilizando microscopio fluorescente invertido inmediatamente después del experimento antes y después de la remoción de la endoprótesis de los tubos. Los resultados mostrados en la Figura 17 demuestran las células fluorescentes rojas presentes en todos los puntales de las endoprótesis 316L de las muestras de endoprótesis que se expusieron al campo 1.5T. Sin embargo, las endoprótesis de control, que tuvieron células (más MNP fluorescente) inyectadas a través de la tubería de polivinilcloruro canulada demostraron solamente células fluorescentes rojas raras. De esta forma, estos estudios

lo tanto permite la selección de la célula magnética. Estos resultados muestran que la selección de MNP simplemente inyectando una suspensión de MNP (sin cargarlas en las células), también seleccionaría una endoprótesis 316L en el campo 1.5T.

#### **Ejemplo 14**

### **Las Nanopartículas Poliméricas Superparamagnéticas Eficientemente Mejoran el Suministro de Acido Nucleico No Viral**

El suministro no viral de ácidos nucleicos para propósitos terapéuticos permanece siendo un reto principalmente debido a una baja eficiencia comparativamente. Se trató este problema utilizando portadores génicos no virales que poseen propiedades de selección magnéticas. Esto se logra mediante suministro seleccionado de fuerzas magnéticas de ácido nucleicos y puede proveer una solución clínicamente viable para la transferencia génica efectiva y no tóxica. En un trabajo previo se desarrolló la modificación de superficie de formulaciones de nanopartículas biodegradables (NP, por sus siglas en inglés) con base en polilactida (PLA) con polietilenimina ramificada (PEI 25K). La literatura científica reciente mostró que la desacilación de preparaciones comerciales de PEI lineal dramáticamente refuerza su eficiencia en el suministro génico debido al aumento el número de nitrógenos protonables, que presumiblemente resulta en una condensación más hermética de

hipótesis de que la transferencia génica no viral puede mejorarse a través del suministro magnéticamente impulsado de NP superparamagnético formulado con PEI lineal desacilado. El PEI lineal sintetizado por hidrólisis catalizada con ácido de 200-kDa de poli(2-etil-2-oxazolina) y ajustado a un pH de 7 se utilizó para formular NP cargado con óxido de hierro por medio de la metodología de evaporación del solvente por emulsión modificada. NP conteniendo 35% de óxido de hierro en peso tuvo un tamaño promedio de  $360 \pm 25$  nm, potencial zeta de  $43 \pm 3$  mV y exhibió propiedades superparamagnéticas (resonancia magnética menor de 0.5% de su valor de saturación magnético). La habilidad de la formulación de PEI-NP lineal para suministrar ácido nucleicos se examinó *in vitro* en células de músculo liso aórticas de rata A10 cultivadas (SMC) y células endoteliales aórticas de bovino (BAEC), utilizando proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) como un gen reportero. Las NP formuladas con PEI ramificado se utilizaron para comparación. Las NP en complejo con ácidos nucleicos se aplicaron a las células por 15 min bajo un campo magnético (500G) medio de cultivo celular conteniendo suero. En un grupo de experimentos, el ADN de plásmido que codifica GFP se suministró a las células y la eficiencia de la transfección se midió fluorométricamente 2, 4 y 8 días después del tratamiento. Los niveles de las NP intracelulares fueron directamente dependientes de la dosis en un intervalo de concentración de NP examinado para ambas formulaciones

veces más altos para ambos tipos de células transfectadas con la formulación PEI-NP lineal. En otro grupo de experimentos, se suministró ARN de interferencia corta (ARNsi) de GFP (eGFP) mejorado a las células y la supresión de la expresión de eGFP en células de músculo liso y endoteliales transducidas así como la viabilidad celular (por AlamarBlue) se midieron fluorométricamente 5 días después del tratamiento. En los experimentos de silenciación de GFP, se obtuvo una eficiente supresión del eGFP utilizando NP magnéticas formuladas con ya sea PEI ramificado o lineal. La supresión de eGFP en células A10 dependió directamente de la dosis de NP para ambos tipos de formulaciones. La supresión de eGFP directamente dependiente de la dosis de ARNsi en el caso de PEI-NP lineal e inversamente dependiente de PEI-NP ramificado resultando en una supresión máxima de 40% para ambos tipos. En BAEC, la supresión de eGFP dependió directamente de la dosis de NP para PEI-NP ramificado solamente. La supresión de eGFP no fue dependiente de la dosis de ARNsi para ambos tipos resultando en una supresión máxima de 50% para ambas formulaciones NP. Los complejos de NP/ARNsi estudiado no comprendieron significativamente la supervivencia celular que muestra más de 90% de células viables 5 días después del tratamiento a dosis de NP máximas para ambos tipos NP y de célula. Se concluye que el PEI-NP lineal magnéticamente sensible una eficiencia aumentada en el suministro de ADN de plásmido contra PEI-NP ramificado a

ambos tipos de NP.

### **Ejemplo 15**

#### **Las Nanopartículas de Oleato de Calcio Conteniendo Catalasa Magnéticamente Dirigida Eficientemente Proteger a las Células Endoteliales de Tensión Oxidante *In Vitro***

Las consideraciones del diseño de grandes nanoportadores enzimático son múltiples. Las condiciones de la síntesis de la partícula y la posterior purificación deberán permitir una eficiente carga de masa proteica a pesar de sostener la actividad enzimática. Con el fin de que los nanoportadores seleccionen terapéuticos antioxidantes, los portadores deberán tener la capacidad de no solamente cargar la enzima activa, sino también de proporcionar protección a partir de la proteólisis. Es deseable idear un nanoportador biocompatible, estable que cargaría la proteína eficientemente sin solventes orgánicos o métodos de emulsión de alto esfuerzo cortante. Con el fin de conservar la actividad proteica, se utilizaron constituyentes solubles que formarían MNP a base de oleato de calcio en medio acuoso, y eliminar la exposición de la proteína al daño mediante, esfuerzo cortante, exposición a solvente e interfaces de aceite y agua.

Estos estudios se llevaron a cabo para evaluar la capacidad de las MNP para cargar las enzimas de muestra y

funcionalidad de las carga proteica. Se examinó la protección de las degradación proteolítica y la liberación de la proteína con e tiempo *in vitro*. Finalmente, se estudió la internalización magnéticamente guiada de las MNP. Su actividad y capacidad antioxidante para prevenir la muerte celular mediada por ROS en el cultivo celular en comparación con controles no magnéticos o de catalasa libre.

Reactivos. El cloruro férrico hexahidratado, el cloruro ferroso tetrahidratado, el oleato de sodio (99% puro), Pluronic® F127, xantina, xantina oxidasa, y pronasa todos se compraron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO). El acetato de uranilo fue de Electron Microscopy Sciences. La catalasa y Cu, Zn superóxido dismutasa, ambos de hígado de bovino, se compraron de Calbiochem (La Jolla, CA). El yodogen y Dylight 488 se compraron de Pierce Biotechnology (Rockford, IL). Otros reactivos se compraron de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Preparación y yodinación de la enzima. La catalasa de hígado de bovino sólida se disolvió en agua DI y dializó (casete de diálisis Slide-a-lyzer, Thermo Scientific, Rockford IL) en amortiguador de pH de fosfato sin sodio. El superóxido dismutasa (SOD) se disolvió en PBS a las concentraciones deseadas. Las concentraciones de proteína finales se determinaron de las curvas de calibración de BSA utilizando un ensayo Bradford estándar medido por absorbencia

(Perkin Elmer, Boston, MA) utilizando el método de yodogen (Pierce Biotech., Rockford, IL) como se describe por el fabricante, y se purificaron del yodo sin unir utilizando cromatografía de penetración de gel (6 columnas de biopsina, Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Fue necesaria una modificación para marcar SOD; la enzima contiene solamente dos residuos de tirosina, en consecuencia el grado de radiomarcación a un pH de 7.4 es pobre. Mediante el uso de amortiguador de pH Tris a un pH de 8.4 se marcaron los residuos de histidina ( $pK_A$  6.5) y la radiomarcación se aumento sobre 4. El grado de marcación y la cantidad de yodo libre se determinó para ambas proteínas utilizando un ensayo de ácido tricloroacético estándar (TCA, por sus siglas en inglés). Se sometió a vórtice una alícuota de 2  $\mu$ l de la enzima marcada, 1.0 ml 3% de BSA y 0.2 ml 100% de TCA y se incubaron a temperatura ambiente por 15 mins. La proteína precipitada se separó del sobrenadante de yodo libre por centrifugación (15 mins, 4 C, 2100 g) y midió utilizando un contador gamma Wizard 1470 (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

La marcación fluorescente de la catalasa se llevó a cabo como se describe por el fabricante a través de marcación reactiva de amina utilizando una fracción de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) para formar un reactivo de acilación reactivo.

Formulación y caracterización de las MNP. Se preparó óxido de hierro nanocristalino por co-precipitación

hierro se maduró mediante incubación por 1 minuto a 90°C, después lavando dos veces con agua desionizada (DI) (Direct-Q 5 System, Millipore, Billerica, MA) a través de decantación magnética en hielo, y finalmente resuspendiendo en 5 ml de solución acuosa conteniendo 225 mg de oleato de sodio por calentamiento a 90°C bajo argón seguido por sonicación en baño (5 min cada uno) repetida en dos ciclos. El ferro-fluido obtenido se filtró a través de una membrana PVDF estéril con un recorte de 5 m.

Para preparar MNP cargadas con enzima, la proteína se agregó al ferro-fluido en una cantidad especificada. Se llevó a cabo una agregación controlada del ferro-fluido en la presencia de Pluronic® F-127 (20 mg) como un estabilizador mediante la adición por goteo de un volumen igual de oleato de calcio acuoso (0.1 M). Las MNP se lavaron dos veces por decantación magnética y finalmente se volvieron a suspender en solución acuosa de glucosa (5% p/v). Las formulaciones marcadas radioactivas se prepararon mezclando una fracción de catalasa marcada con  $^{125}\text{I}$  para la proteína antes del paso de agregación controlada. Las formulaciones de nanopartículas no magnéticas impregnadas con enzima o MNP en blanco utilizadas como controles se prepararon como se describe anteriormente sin la incorporación de óxido de hierro o enzima, respectivamente.

Tamaño de partícula, concentración y comportamiento

transmisión (JEOL JEM-100CX TEM West Chester, PA). Las distribuciones del tamaño de partícula y el radio hidrodinámico medio de las muestras diluidas 200-400x, se derivan del segundo orden del coeficiente de difusión de la ecuación de Stokes Einstein. La concentración del número de partículas se deriva mediante el balance de masa de densidad experimentalmente determinada de la solución de muestra, peso seco, y tamaño de partículas.

Para la microscopía de electrón de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), se agregaron 2-5  $\mu$ l de muestra de MNP diluidos 20x en 0.2  $\mu$ m de agua DI filtrada a las rejillas de la malla TEM individuales (Formvar Film 200 mesh, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), la muestra en exceso se filtraron con papel filtro. Las rejillas se secaron en disecador al vacío durante al menos 1 hora antes de explorarlas con un voltaje de aceleración de 80 keV.

Para determinar el comportamiento magnético de las MNP, se secaron al aire 5  $\mu$ l de la suspensión en un portaobjetos con cubierta de vidrio, y las mediciones de la histéresis se hicieron utilizando un magnetómetro de gradiente alternante (Princeton Measurements Corp., NJ).

Concentración de hierro. El hierro retenido en las partículas se midió en muestras por triplicado contra una curva de calibración construida de una mezcla molar de 2:1 de cloruro ferroso y férrico en un intervalo de 0.1-25.0 mg/ml.

por 1 hora. La absorción de la luz se leyó a 410 nm.

Carga de enzima. La incorporación de proteína en las MNP se determinó midiendo la distribución de la SOD o catalasa radiomarcada entre MNP magnéticamente separadas y la fase acuosa externa utilizando un contador gamma. El porcentaje retenido se definió como el cociente de la actividad en la muestra final con el de la suspensión original ajustada por cambios de volumen.

Actividad enzimática. La actividad de la catalasa se determinó utilizando el ensayo de degradación de peróxido ácido estándar. Se agregaron 5 mM de solución de  $H_2O_2$  amortiguada en pH (990-998  $\mu$ l) a un tubo de cuarzo y la absorbencia a 242 nm se leyó a temperatura ambiente. La catalasa conteniendo partículas se diluyó a una concentración de catalasa final de  $\sim 0.01$ - $0.50$   $\mu$ g/ml correspondiente a la región lineal del gráfico de calibración en donde el declive de la curva de descomposición fue proporcional a la concentración de la catalasa adicionada. Se diluyeron típicamente de 2 a 10  $\mu$ l de MNP para formar un volumen total de 1.0 ml. La concentración del  $H_2O_2$  se monitoreó contra el tiempo y la actividad de la catalasa se calculó a partir del declive de la curva de descomposición en donde la actividad de 1 unidad = 23 ( $\Delta$  Abs/t).

La actividad de SOD se determinó utilizando el ensayo C de citocromo. El ensayo C de citocromo utiliza

indicador que compete con SOD. Una solución conteniendo 50 mM de amortiguador de pH de fosfato, pH 7.8, 0.1  $\mu$ M de EDTA, 50  $\mu$ M de xantina, 20  $\mu$ M citocromo C y 10  $\mu$ l de muestra. La reacción se inició mediante la adición de 10  $\mu$ l de 0.2 U/ml de xantina oxidasa. La absorbencia se monitoreó a 550 nm. Se define una unidad de SOD como la cantidad de enzima que inhibe el grado de reducción de citocromo C en 50% a pH 7.8 y 25°C.

Protección y actividad de catalasa encapsulada en MNP. La capacidad de las MNP para proteger la carga de catalasa se midió utilizando un ensayo de proteólisis. Las muestras se incubaron por 60 min a 37°C con agitación en una Pronasa amortiguada en pH de 2.0% en peso, una mezcla robusta de proteinasas que completamente digieren las proteínas en aminoácidos individuales. La cantidad de catalasa retenida por las MNP después de la proteólisis se determinó después de la separación de las MNP por centrifugación (20 min, 4°C a 16.1 g) utilizando el ensayo de radioactividad descrito anteriormente. La actividad enzimática de la catalasa unida a las MNP retenida con el tiempo se midió en comparación con catalasa libre.

Liberación de la catalasa *in vitro* de MNP. Los cinéticos de liberación de la catalasa de MNP en fluidos biológicos a temperatura fisiológica relevante se midió monitoreando la catalasa libre en el medio de liberación

alícuotas se tomaron durante un período de 48 horas y las MNP se separaron del medio utilizando 0.2  $\mu$ m de unidades de filtro de centrifugación (Millipore, Billerica MA.). Se hizo una corrección para la fracción de MNP determinada en el filtrado (< 10%). La radioactividad de la catalasa unida a MNP retenida por los filtros y la proteína libre en el medio se midieron utilizando un contador gamma.

Cultivo Celular. Las células endoteliales aórticas de bovino (BAEC) se obtuvieron y cultivaron en DMEM (Mediatech, Inc., Herndon, VA, USA) suplementado con 10% de suero de becerro fetal. Las células endoteliales de la vena umbilical de humano primarias, 4o. pasaje (HUVECs, Clonectics, San Diego, CA) cultivadas cerca de confluencia se cultivaron en placas de 24 o 96 cavidades cubiertas con 1% de gelatina. Las células se mantuvieron en medio M199 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 15% de suero de bovino fetal y 100  $\mu$ g/ml de heparina (Sigma), 0.1% de suplemento de cultivo celular endotelial (Upstate, Lake Placid, NY), 0.1  $\mu$ g/ml de Glutamax, y 1.0% de antibiótico-antimicótico (Gibco).

Suministro magnéticamente guiado de MNP a BAEC. Las BAEC sembradas a confluencia en una placa de 96 cavidades se incubaron con MNP por 5 min con/sin la presencia de un campo magnético de alto gradiente utilizando un separador magnético de 96-cavidades con un densidad de fuerza transversal

medio de cultivo celular fresco y examinaron microscópicamente para la internalización de las MNP 4 horas después del tratamiento.

Protección magnéticamente mejorada de HUVEC de tensión oxidante por MNP. La HUVEC confluentes sembradas en placas de 24 cavidades se incubaron con MNP a 37°C con o sin una exposición magnética por 15 min. Las MNP después se aspiraron y las células se enjuagaron con medio de cultivo celular fresco. Las nanopartículas magnéticas no cargadas con catalasa o MNP en blanco (sin catalasa) se utilizaron como controles. Las células se trataron con 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluido en medio de cultivo celular por 5 horas, enjuagaron con medio fresco, después se tiñeron por 15 min con una solución de 2 µM de Calceína AM (Invitrogen, CA) en PBS suplementado con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. La fluorescencia de las células viables se midió después de lavar a λ<sub>em</sub>/λ<sub>ex</sub> de 485 nm/535 nm.

## Resultados

Propiedades fisicoquímicas de las MNP (Tamaño de partícula). El tamaño de partícula de las MNP cargadas con catalasa determinado por análisis digital de múltiples imágenes TEM (ejemplo en la Figura 18A) mostró un tamaño promedio de 303 +/- 38 nm. La diseminación de luz dinámica (DLS) de formulaciones equivalentes mostró un tamaño de partícula promedio de 340 +/- 29 nm (Figuras 18C y 18D). Por mediciones de diseminación de luz dinámica, las partículas

como siendo ~21% en peso según medido por el ensayo colorimétrico. El comportamiento magnético de las MNP se muestra en la Figura 18B. El momento magnético en la saturación ( $M_s$ ) es 14.3 emu/g. La remanencia magnética ( $M_r$ ), la magnetización después de remover el campo magnético es 0.65 emu/g. La retención de la magnetización como un porcentaje,  $M_r/M_s$ , por consiguiente es 4.5%. El ciclo de histéresis cerrado en la Figura 18B muestra que las partículas inmediatamente regresan al equilibrio con la remoción del campo magnético.

Carga de masa enzimática y actividad. Como un porcentaje de la proteína agregada retenida por las partículas purificadas, la carga de masa de SOD en MNP fue de 39 +/- 1%, 34 +/- 1% por 0.5 y 1.0 mg de adición de proteína respectivamente (Figura 19A). Esto corresponde a aproximadamente 7500 y 15000 moléculas SOD por partícula según calculado de la masa cargada (Figura 19B). La carga de catalasa en diferentes adiciones de masa se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de las MNP contra adición de catalasa

| Masa de catalasa adicionada | Diámetro (mm) | % de masa de catalasa cargada | % de masa de catalasa protegida | % de actividad de catalasa retenida |
|-----------------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 0                           | 336 ± 15      |                               |                                 |                                     |
| 0.2                         | 341 ± 29      | 24.1 ± 9.8%                   | 29 ± 1.0%                       | 29.4 ± 1.0%                         |
| 2                           | 365 ± 29      | 20.4 ± 0.6%                   | 11.4 ± 0.4%                     |                                     |
| 4                           | 399 ± 14*     | 33.0 ± 5.0%                   | 22.7 ± 2.1%                     | 23.1 ± 0.6%                         |
| 6                           | 385 ± 3.0**   | 28.0 ± 3.0%                   | 25.9 ± 2.3%                     | 33.9 ± 4.8%                         |
|                             |               |                               |                                 | 20.2 ± 4.2%                         |

El error es la desviación estándar,  $n \geq 3$ . Diferencia de tamaño \* $p=0.0145$ . \*\* $p=0.0017$  comparado con MNP en blanco.

Retención de actividad de SOD en MNP a ambas cargas de masas promediadas agregadas  $17.2 \pm 2\%$ , que corresponde a un promedio de 47% de actividad retenida de masa cargada (Figura 19C). La actividad de la catalasa en MNP retenidas alcanza un máximo de aproximadamente 12 unidades k a 4 mg de adición de masa (Figura 19B) que corresponde a aproximadamente 34% de actividad retenida (Tabla 1). Otras adiciones de masa estuvieron en el intervalo de 20-29% con la actividad mínima cargada encontrada con la máxima adición de masa 6 mg (Tabla 1).

Masa de catalasa protegida por MIMP y actividad *in vitro*. La masa de catalasa protegida de la prototípica contra

catalasa cargada y protegida se muestra en la Figura 21A. Las MNP retuvieron 20% de actividad de partida a las 24 horas de la exposición a enzimas proteolíticas comparado con la desactivación total de la enzima libre en 30 mins (Figura 21B).

La estabilidad de las MNP según definida por la retención de catalasa con exposición a plasma se muestra en la Figura 22. Las partículas liberaron cerca de 15% de catalasa a 48 horas de la exposición a plasma a 37°C comparado con una liberación casi equivalente con la solución de control.

Suministro de MNP magnéticamente impulsado a células endoteliales *in vitro*. Las MNP incubadas con células endoteliales expuestas a un campo magnético por 10 min se muestran en las Figuras 23A y 23B. La micrografía de contraste en 23A muestra las MNP dentro de citosol de las células endoteliales que rodean el núcleo. La fluorescencia verde en la Figura 23B indica la carga de proteína de las partículas suministradas a las células. La Figura 23C muestra la catalasa de las MNP dentro de las células con una exposición de 5 min. La asociación de los nanoportadores con las células sin exposición a un campo magnético se muestra en las Figuras 23D y 23E.

Protección de células endoteliales de tensión oxidante. La intensidad de la fluorescencia se utilizó para

La catalasa magnéticamente suministrada dentro de las MNP mostró un efecto protector de la viabilidad de la célula de  $62 \pm 12\%$  con relación a las células no tratadas cuando se exponen a 10 mM de peróxido ácido por 5 horas como se muestra en la Figura 24B. No existe una diferencia estadística entre los efectos protectores de las MNP sin guía magnética, los portadores sin catalasa, o con catalasa libre adicionada con portadores.

Resumen. Este estudio describe un sistema nanoportador de proteínas grandes, biocompatible único que carga la enzima eficientemente, sin excesiva pérdida de actividad para ambos SOD y catalasa, y provee la protección de la actividad enzimática de la proteólisis con la formulación de catalasa, una enzima más grande y lábil, y por consiguiente más retador de proteger. Además, a través de la selección magnética el sistema portador demostró un potencial terapéutico al combatir un severo insulto oxidante *in vitro*. Este nuevo método para seleccionar el suministro de enzimas no solamente puede trasladarse a otros terapéuticos, grandes moléculas, péptidos y aplicaciones de nucleótido, pero como se demuestra por la capacidad de los nanoportadores para retener la carga en plasma, muestra la viabilidad y robustez para explorar modificación de superficie para la inmunoselección potencial. Los atributos de este sistema portador descritos podrían trasladarse a numerosas patologías relacionadas con la tensión oxidante.

### **Selección del Anticuerpo de Nanopartículas Magnéticas que Contienen Catalasa *in vitro* e *in vivo***

Estos estudios se llevaron a cabo para ensayar la capacidad de estos nanoportadores magnéticos (MNP) para cargar y suministrar enzimas antioxidantes activas a objetivos endoteliales *in vitro* e *in vivo*.

A pesar de que las enzimas antioxidantes tales como las catalasas pueden aliviar la tensión oxidante, tienen poca afinidad intrínseca para sitios objetivo *in vivo* y son vulnerables a la proteólisis y la depuración reticuloendotelial (RES, por sus siglas en inglés). Para resolver estos problemas, la catalasa (PM ~250kDa) se encapsuló en nanopartículas magnéticas con base de oleato cálcico, biocompatible utilizando una precipitación controlada de las fases acuosas como se describe con detalle en el Ejemplo 15 (Ver "Formulación y Caracterización de la MNP"). El proceso de dos pasos de la formulación de la MNP se muestra esquemáticamente en las figuras 25A y 25B.

Los cationes de calcio forman complejos de aniones de oleato, formando partículas (un diámetro promedio de ~400 nm por DLS) que se estabilizan en la superficie por el agente tensioactivo Pluronic® F127. La catalasa se asocia con complejos formadores presumiblemente a través de interacciones hidrófobas y de carga. La sensibilidad magnética de las nanopartículas permite su rápida separación

eficiencia de la carga es de 20-30% con 80% de esa actividad retenida. Aproximadamente 20% de catalasa cargada con MNP fue resistente a la proteólisis *in vitro* por medio de la mezcla no específica, pronasa.

Para seleccionar MNP para células endoteliales, el agente tensioactivo Pluronic® F127 se biotiniló dos veces para incorporar el anticuerpo de selección conjugado con estreptavidina al antígeno endotelial, PECAM (Ab62) (Tabla 2). La afinidad de la estreptavidina (SA) a la MNP biotinilada de superficie se midió contra el control (Figura 26A).

Tabla 2. Propiedades dela MNP contra el grado de biotinilación.

| % de Plurónico biotinilado | Diámetro (nm) | % de masa de Catalasa cargada | % de masa de Catalasa protegida | % de actividad de Catalasa retenida | % de Plurónico retenido total |
|----------------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0                          | 399 ± 14      | 33 ± 5.0%                     | 22.7 ± 21%                      | 33.9 ± 4.8%                         | 19%                           |
| 2                          | 420           | 34                            | 18.3                            | 25.1                                | 15%                           |
| 5                          | 475           | 33.4                          | 16.2                            | 20.7                                |                               |

terapéutico anti-PECAM contra IgG las partículas decoradas se incubaron con células endoteliales umbilicales humanas (HUVEC). El rastreo de isótopo y fluorescencia mostró que anti-PECAM (Ab62)/MNP, pero IgG/MNP (control) se une a HUVEC (Figura 26) y protege las células de tensión oxidante infringida por peróxido ácido ( $76\% \pm 5\%$  de protección según medido por liberación de  $^{51}\text{Cr}$ ) (Figura 27). La inyección intravenosa de anti-PECAM(Ab62)/MNP radiomarcado, pero no de IgG/MNP (control) en ratones C57BL/6 condujo a una retención pulmonar 28 veces mayor de anti-PECAM/MNP ( $212 \pm 25\%$  ID/g es decir, 27.6 veces mayor que IgG/MNP), indicando la selección efectiva para el endotelio vascular (Figura 28).

Estos datos muestran lo siguiente: (1) Los nanoportadores magnéticos con base en oleato de calcio forman e incorporan catalasa establemente; (2) Los nanoportadores magnéticos cargan y protegen la catalasa en términos de masa y actividad; (3) La inclusión de Pluronic® F-127 biotinilado permite el acoplamiento SA-anticuerpo a las MNP; (4) El recubrimiento de superficie de anticuerpos anti-PECAM en MNP permite el suministro seleccionado de MNP a ECS; (5) Las MNP cubiertas con anticuerpo Anti-PECAM se endocitan por medio de células endoteliales a  $37^{\circ}\text{C}$ ; (6) Ambos suministros de MNP magnéticas y guidas por anticuerpo proveen protección de EC de daño oxidante; y, (7) Las MNP cubiertas con el anticuerpo anti-PECAM específicamente seleccionan el endotelio pulmonar. Estos datos sugieren una alta eficiencia potencial de terapias de

La presente invención no está limitada a las modalidades descritas y ejemplificadas anteriormente, sino es capaz de variación y modificación dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

### REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Una partícula terapéutica caracterizada porque comprende un material magnético o magnetizable, un estabilizador, un ácido graso o una de sus sales, y una proteína.

2. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el material magnético o magnetizable es un material superparamagnético.

3. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el ácido graso es ácido oleico o una de sus sales.

4. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la proteína es una enzima antioxidante.

5. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque la enzima antioxidante es catalasa, superóxido dismutasa, o glutathione peroxidase.

6. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el estabilizador está biotinilado.

7. La partícula terapéutica de conformidad con la

8. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo se une al estabilizador.

9. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo específicamente se une a un antígeno en la superficie de una célula endotelial.

10. Un sistema para proteger una célula del daño oxidante, caracterizado porque comprende:

una partícula que comprende un material magnético o magnetizable y por lo menos una enzima antioxidante; y

una fuente de campo magnético para generar un campo magnético uniforme capaz de magnetizar el material magnético o magnetizable próximo a la célula durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula internalice la partícula.

11. El sistema de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la célula es una célula endotelial.

12. El sistema de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la célula endotelial es una célula del endotelio vascular.

13. El sistema de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la enzima antioxidante es catalasa, superóxido dismutasa, o glutathione peroxidasa.

comprende un anticuerpo que específicamente se une a un antígeno en la superficie de la célula.

15. El sistema de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la célula está en el cuerpo de un mamífero.

16. Un sistema para magnéticamente seleccionar una proteína para un dispositivo implantado, caracterizado porque comprende:

- (a) un dispositivo para el implante en un sujeto;
- (b) una pluralidad de partículas, cada partícula comprende un primer material magnético o magnetizable y la proteína;
- (c) una fuente de campo magnético para generar un campo magnético uniforme capaz de magnetizar materiales magnetizables, el campo magnético uniforme genera un gradiente de campo magnético próximo al dispositivo implantado; y
- (d) medios para remover una o más de la pluralidad de partículas que no se suministran al dispositivo implantado del sujeto,

en donde el dispositivo implantado comprende un segundo material magnético o magnetizable, y el gradiente selecciona una o más de la pluralidad de partículas para el dispositivo implantado.

17. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la proteína es una

reivindicación 17, caracterizado porque la enzima antioxidante es una catalasa, superóxido dismutasa, o glutationala peroxidasa.

19. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque cada una de la pluralidad de partículas es la partícula de conformidad con la reivindicación 1.

20. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el dispositivo implantado es una endoprótesis.

21. El sistema de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la endoprótesis se forma de acero inoxidable 304.

22. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la fuente del campo magnético comprende un par de electromagnetos capaces de generar el campo magnético uniforme.

23. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la fuente del campo magnético comprende un magneto permanente operable para generar el campo magnético uniforme.

24. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el primer material magnético o magnetizable comprende un material superparamagnético.

25. El sistema de conformidad con la

magnetizable y paclitaxel.

26. La partícula terapéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque además comprende paclitaxel.

### RESUMEN DE LA INVENCION

Se proveen sistemas y métodos para la selección magnética de partículas terapéuticas. Las partículas terapéuticas comprenden uno o más materiales magnéticos o magnetizables y al menos un agente terapéutico. Las partículas terapéuticas se seleccionan específicamente utilizando campos magnéticos uniformes capaces de magnetizar materiales magnetizables, y pueden seleccionar ubicaciones particulares en el cuerpo, o pueden seleccionar la captura, contención y remoción. Las partículas terapéuticas pueden comprender enzimas antioxidantes, y pueden seleccionar células para proteger las células del daño oxidante.

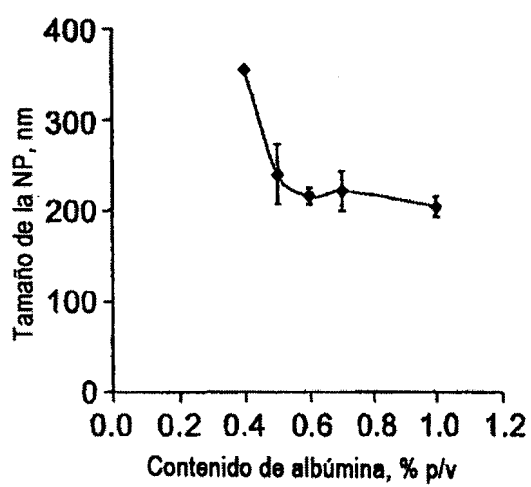


Fig. 1A

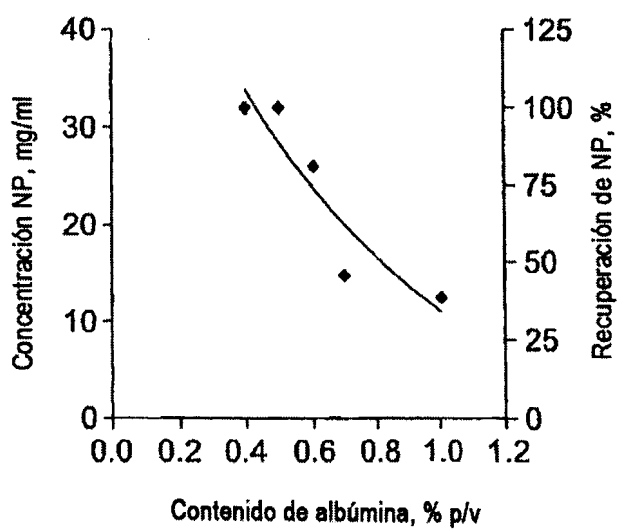


Fig. 1B

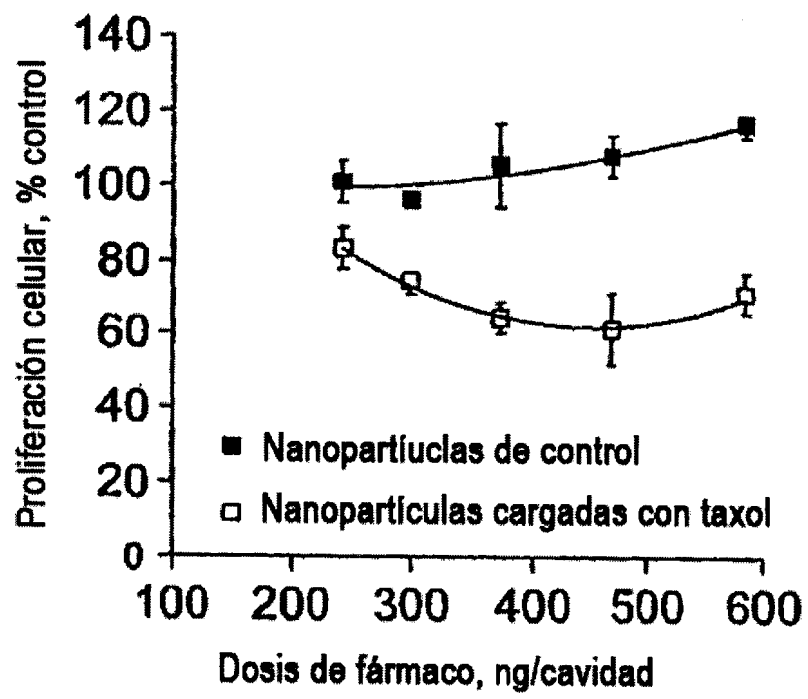


Fig. 2

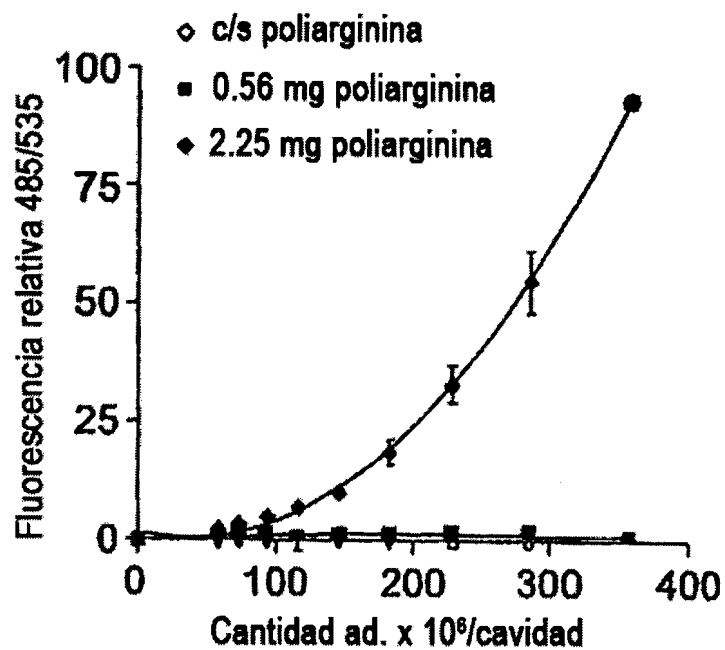


Fig. 3A

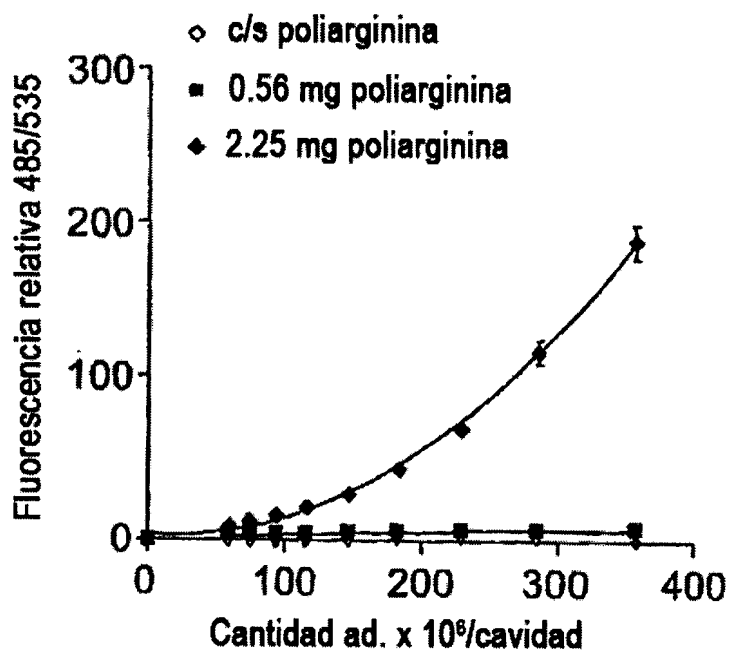


Fig. 3B

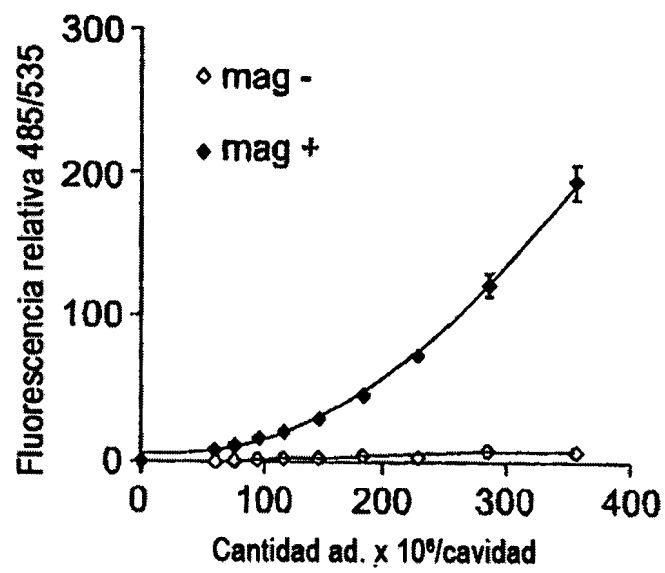


Fig. 3C

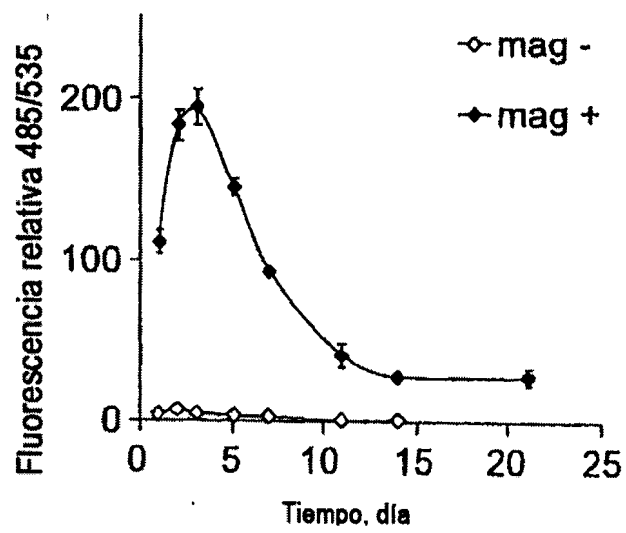
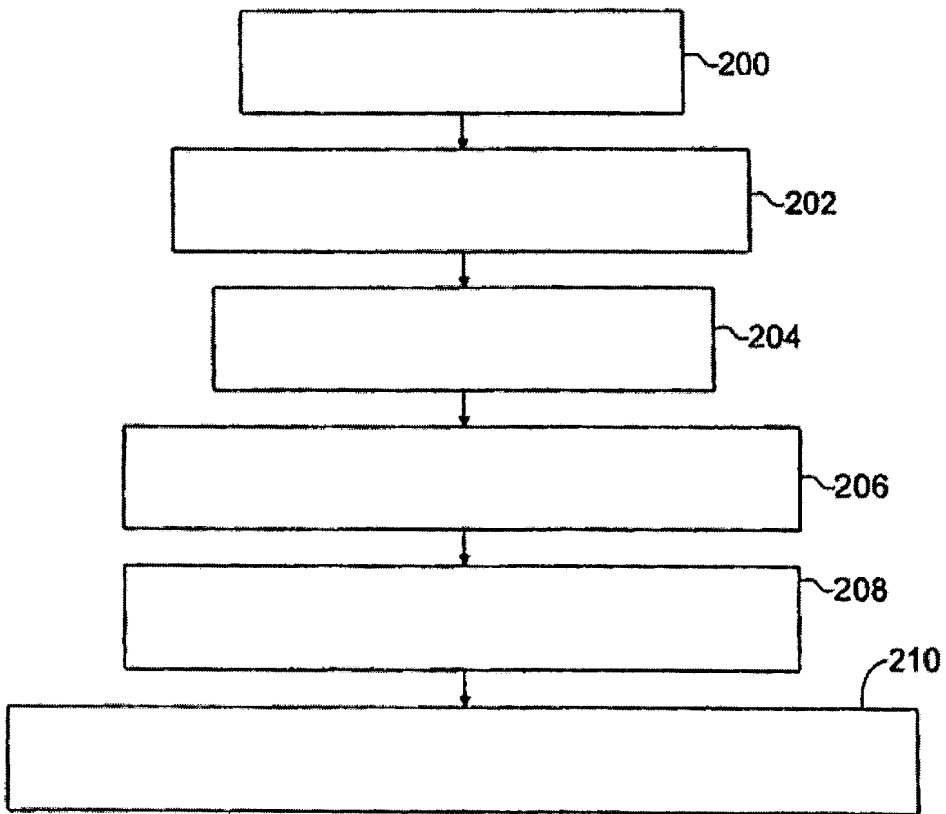
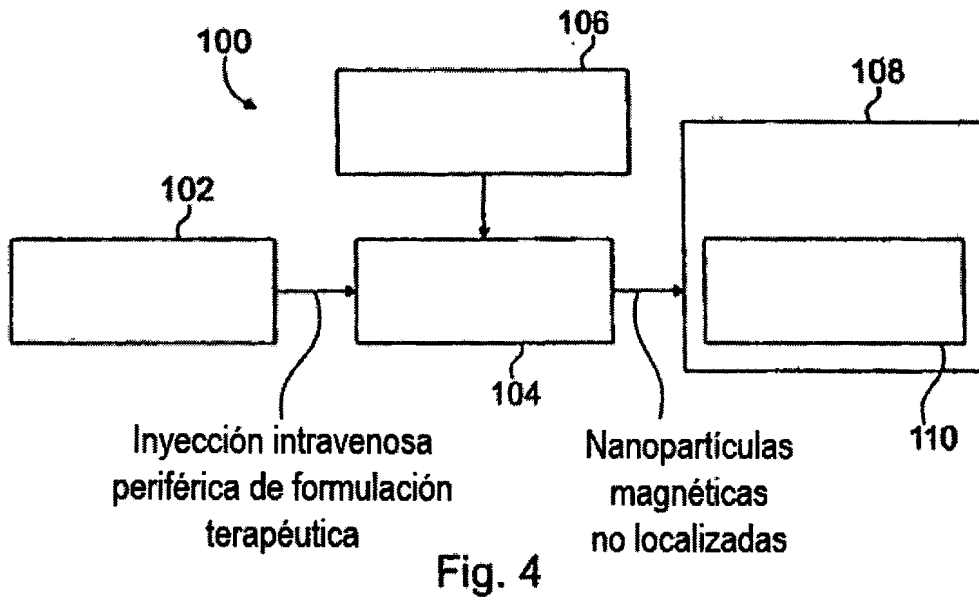


Fig. 3D



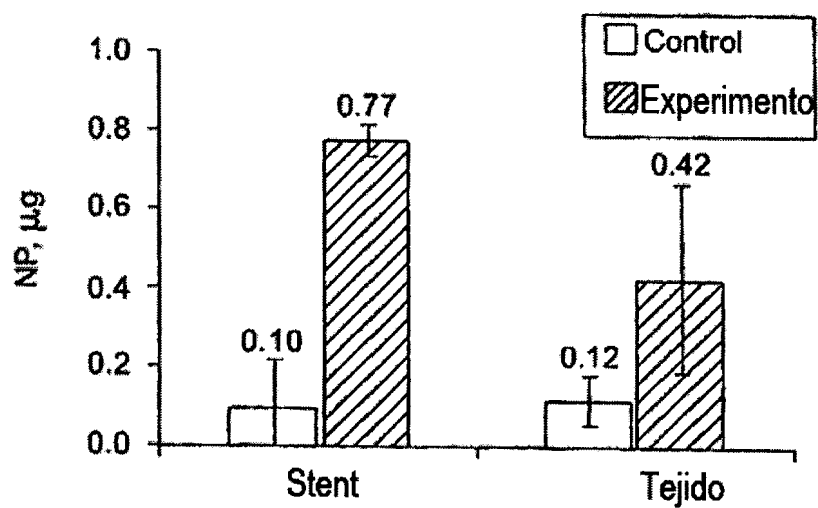
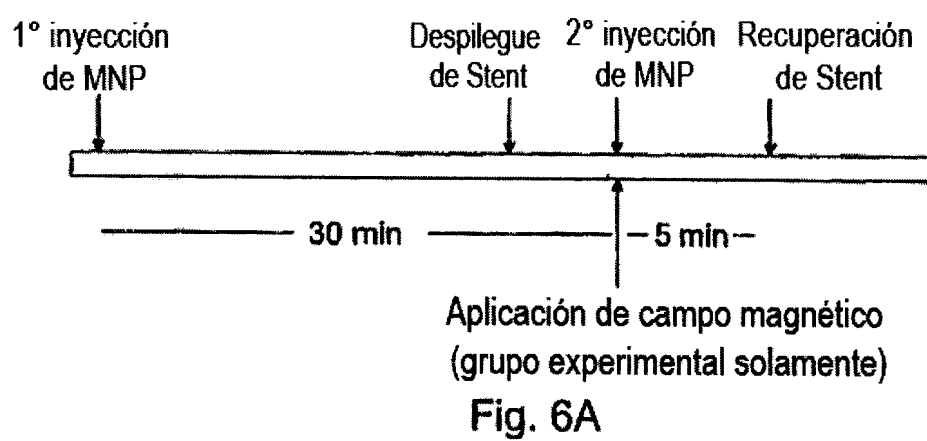
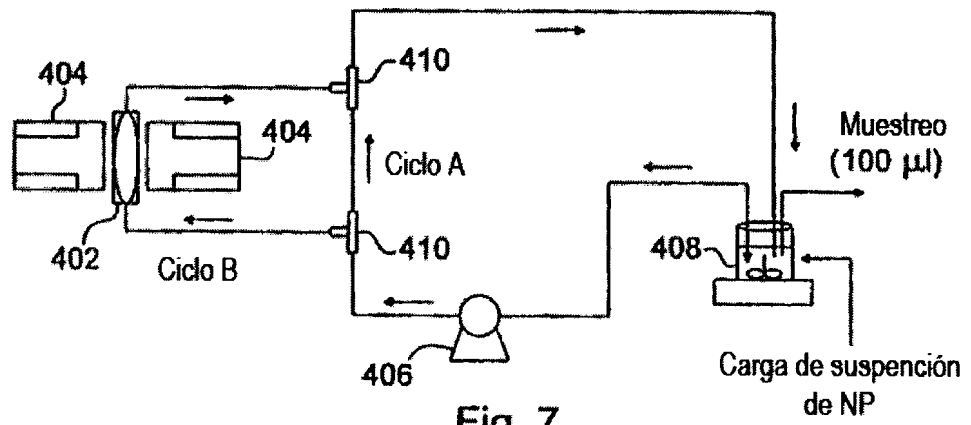


Fig. 6B



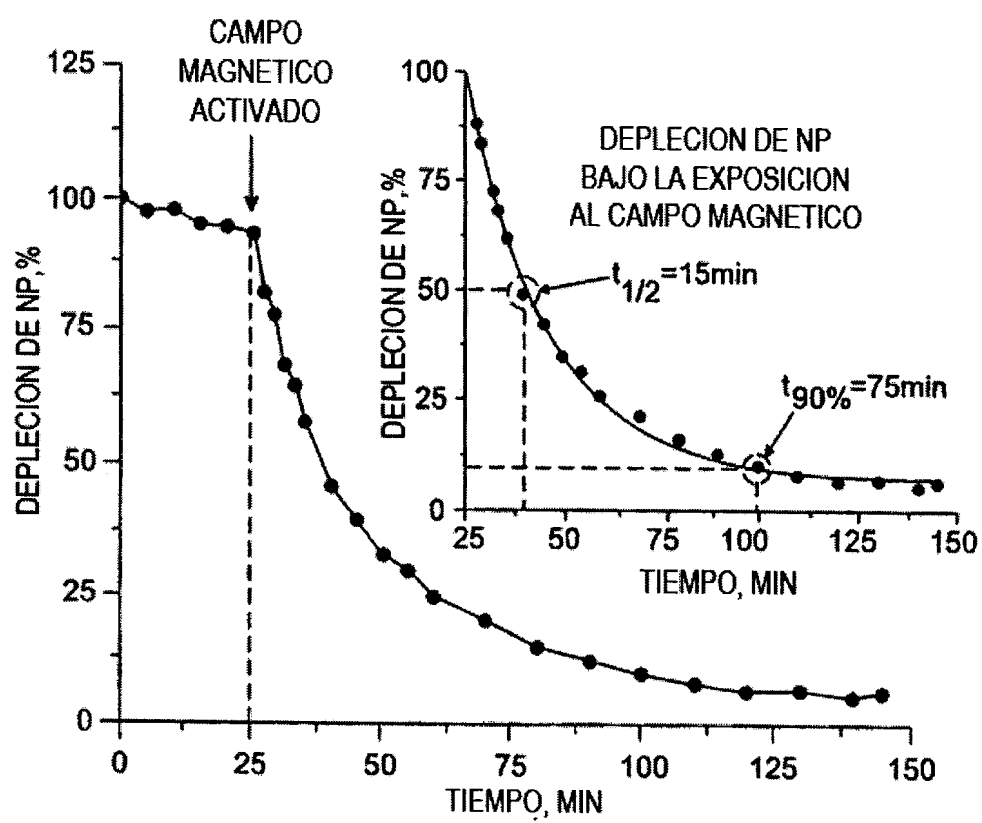


Fig. 8

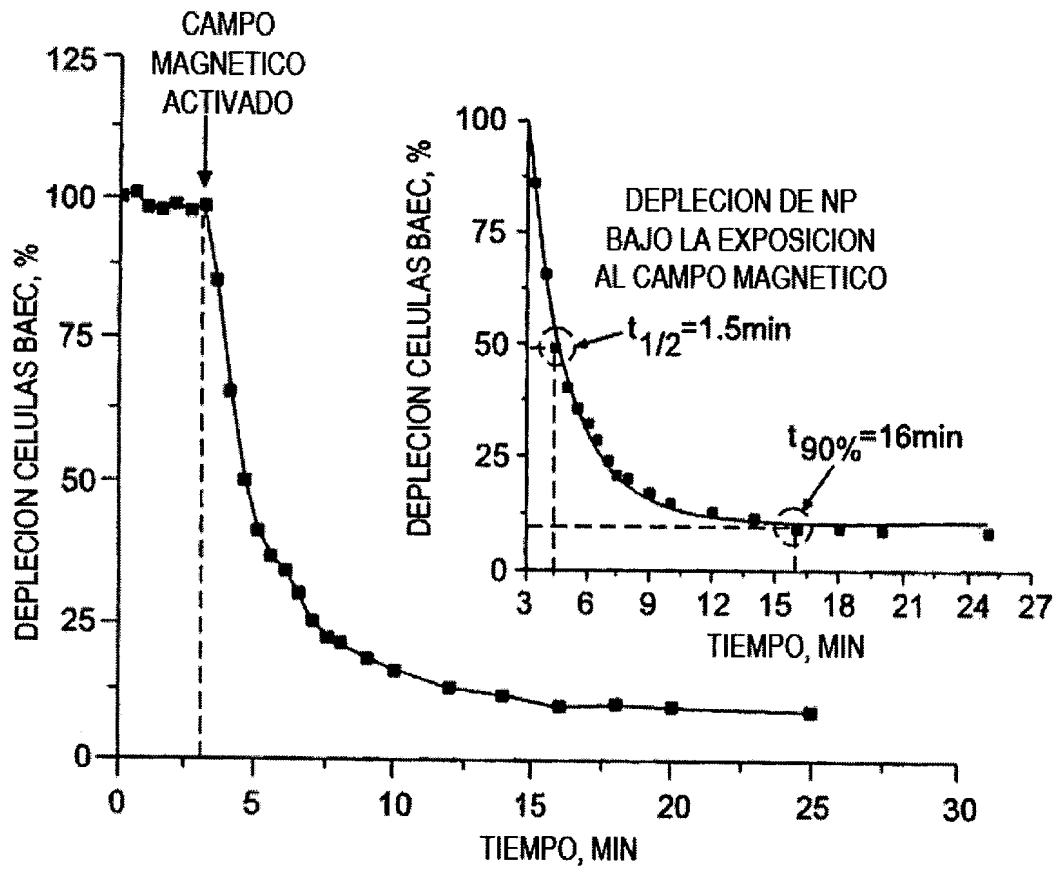
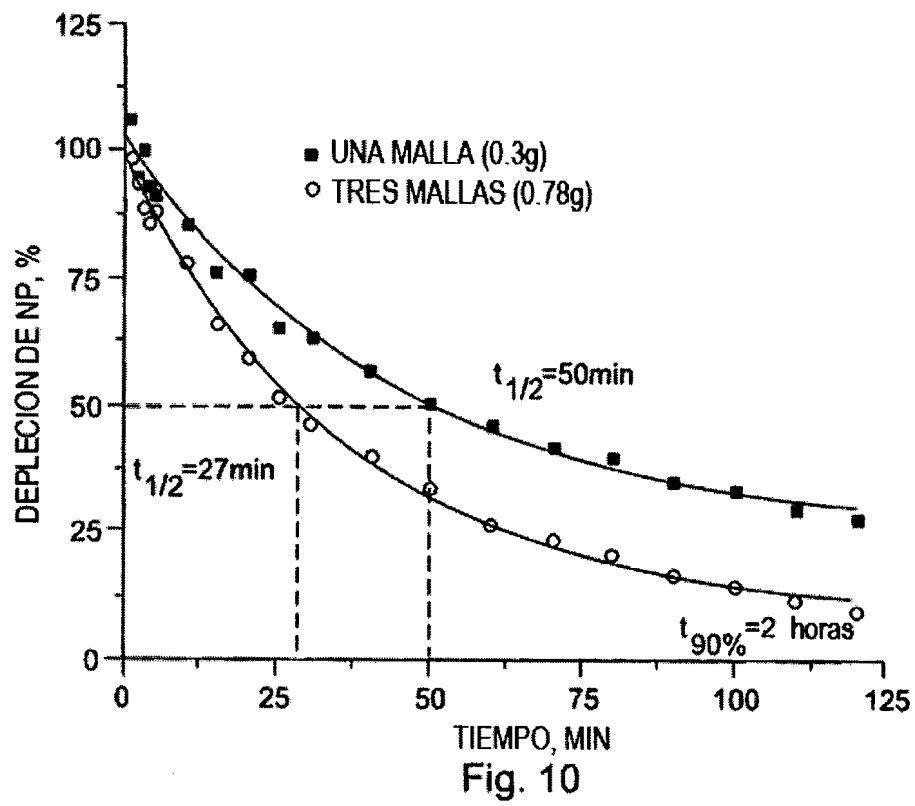
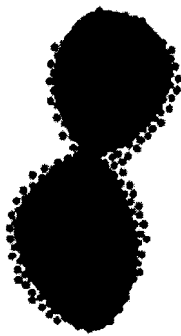


Fig. 9





100nm

Fig. 11A

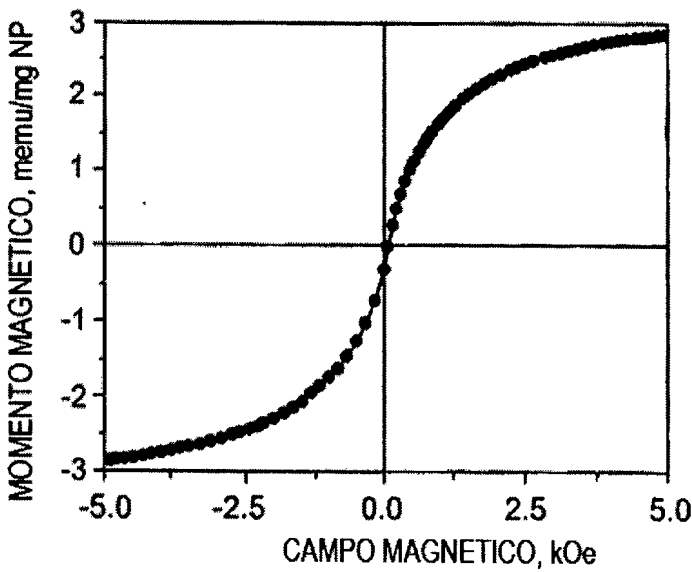


Fig. 11B

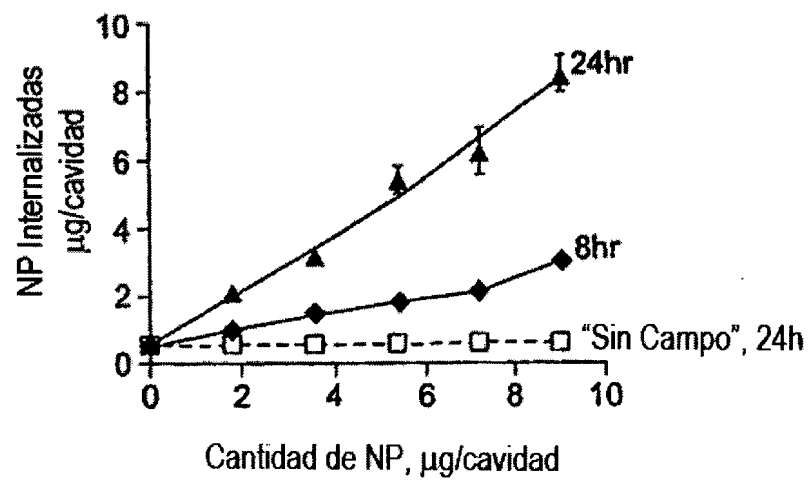


Fig. 12A

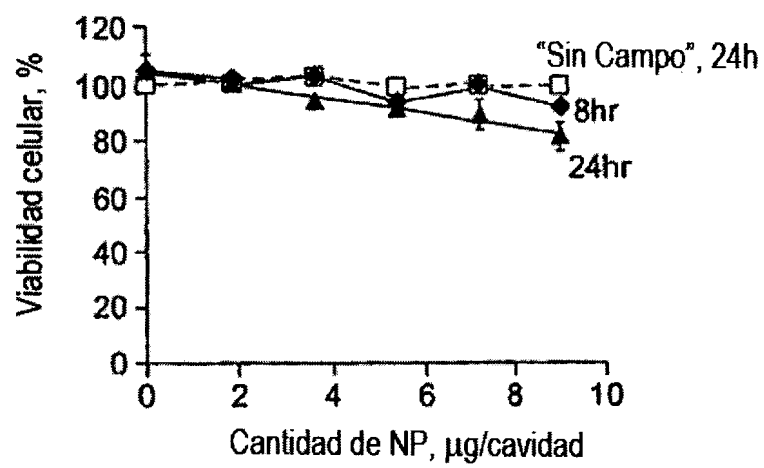


Fig. 12B

A10

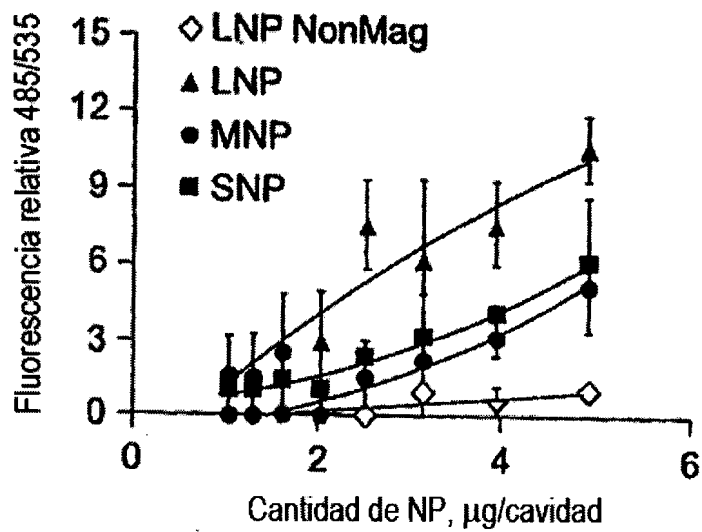


Fig. 13A

BAEC

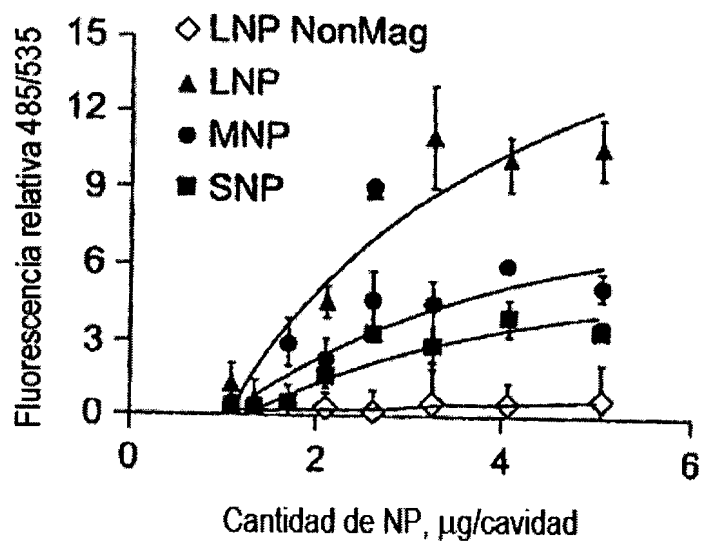


Fig. 13B

A10

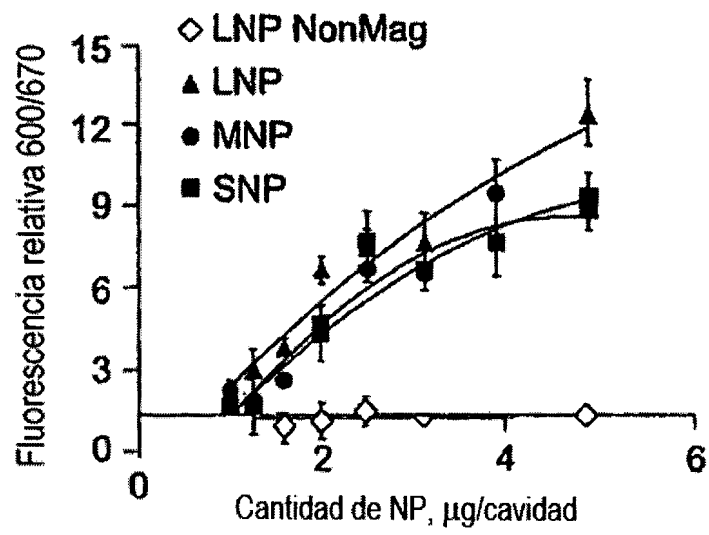


Fig. 13C

A10

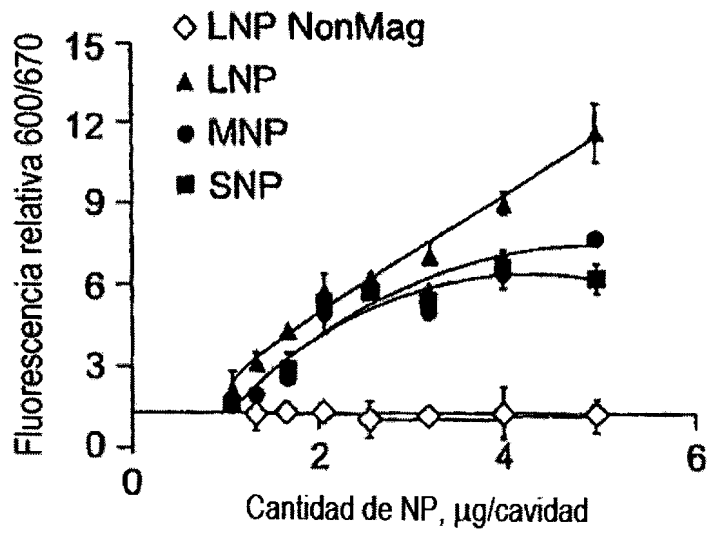


Fig. 13D

A10

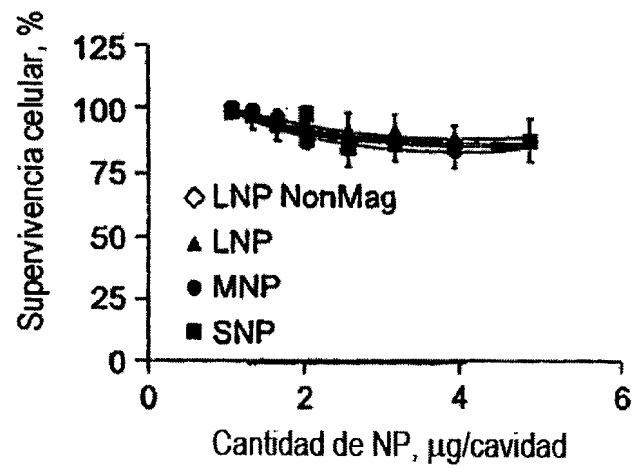


Fig. 13E

BAEC

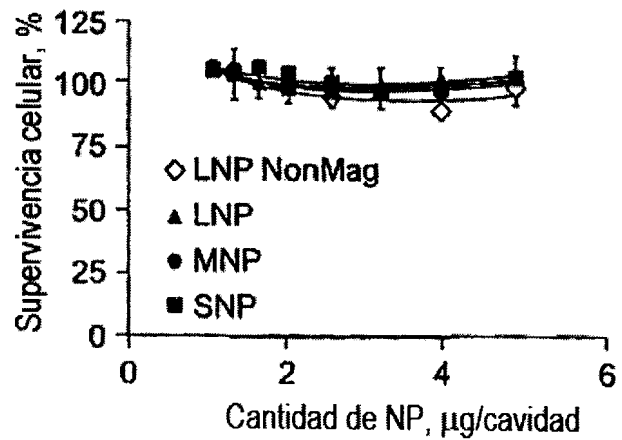


Fig. 13F

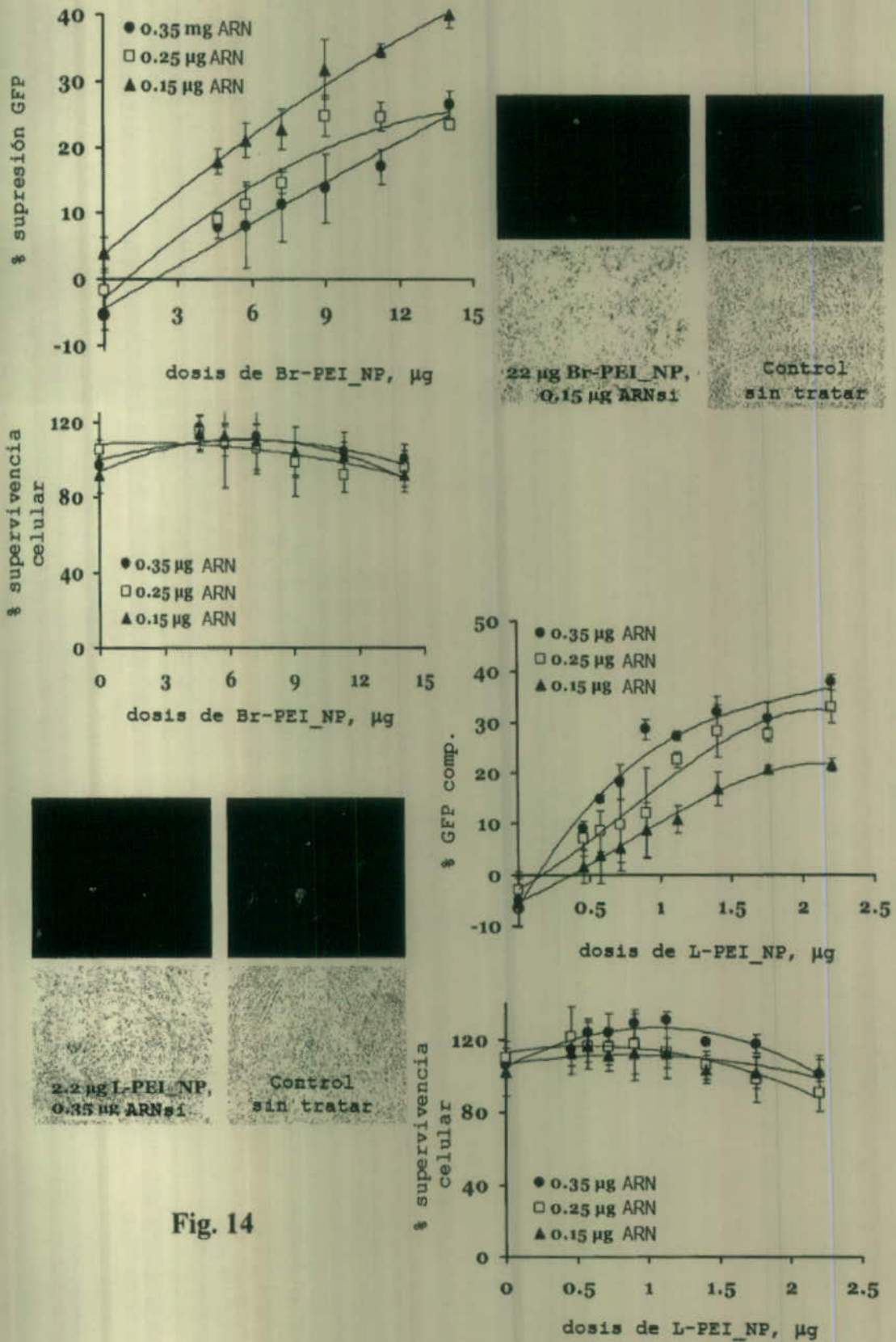


Fig. 14

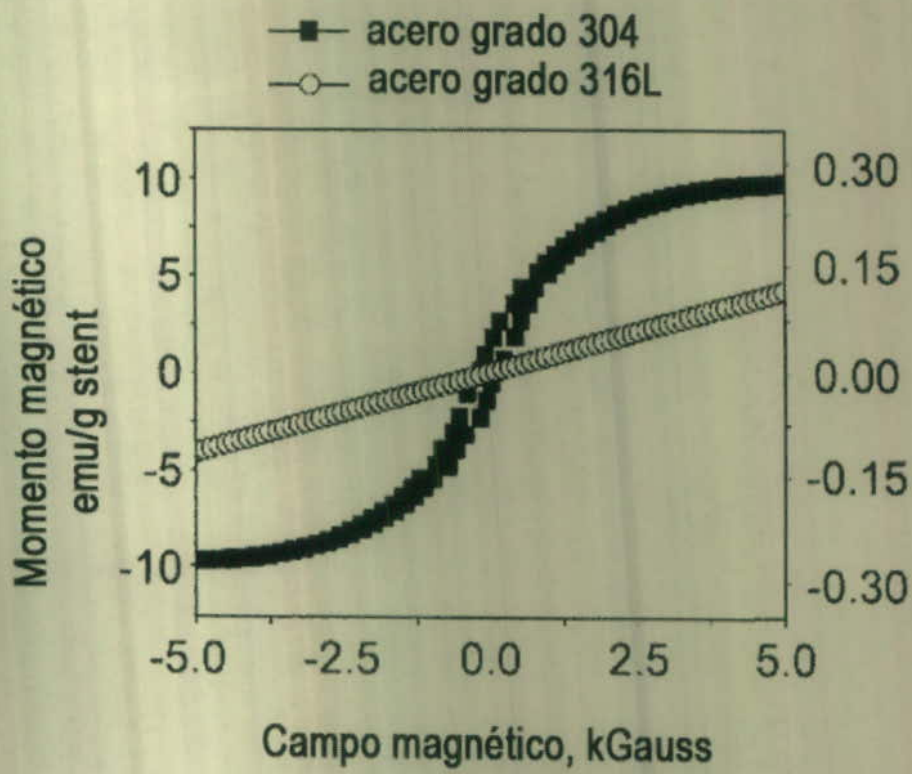
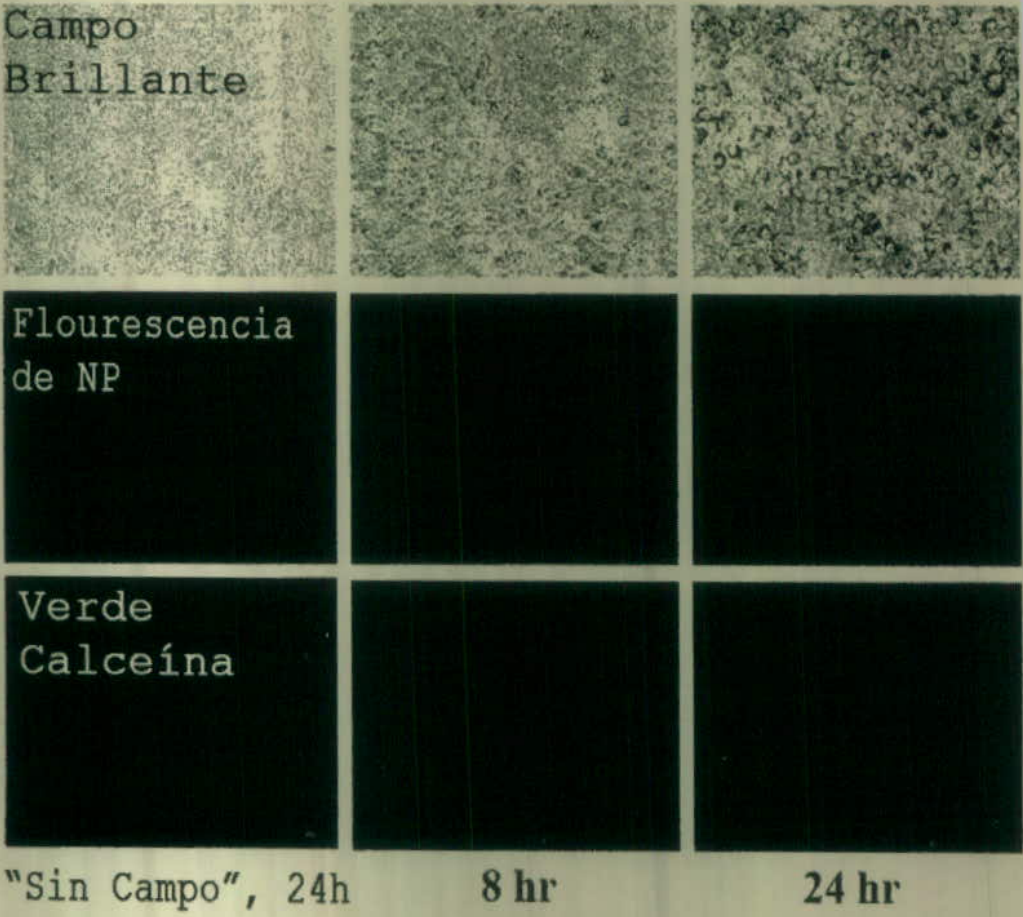


Fig. 15A



Dosis de NP: 9 µg/cavidad

Fig. 15B

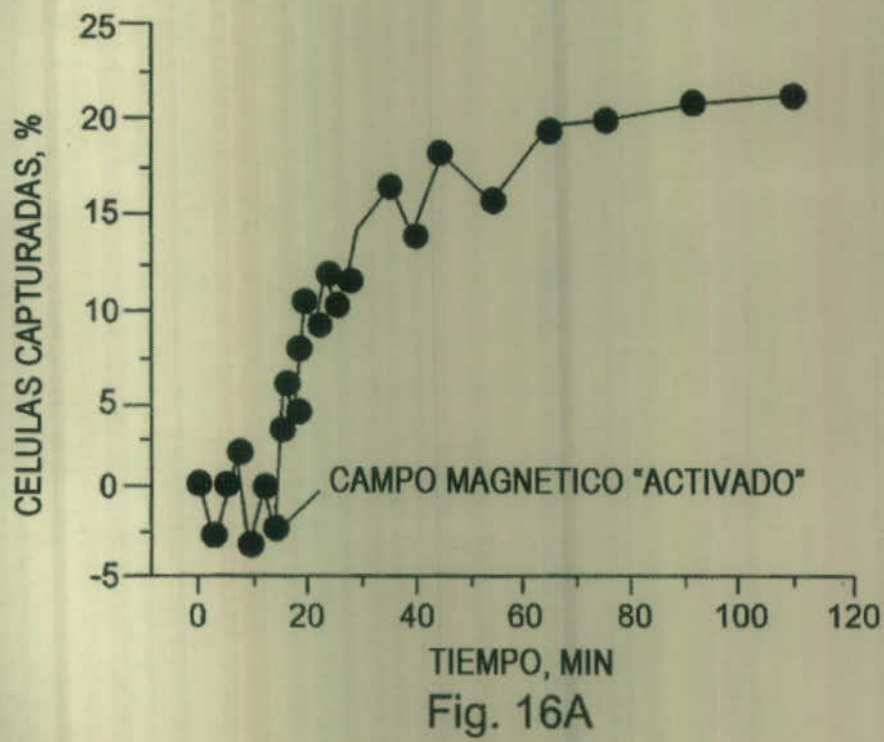


Fig. 16B



Fig. 16D



Fig. 16C



Fig. 16E

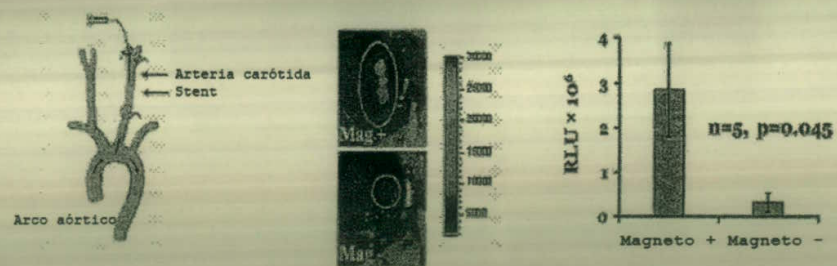


Fig. 16F

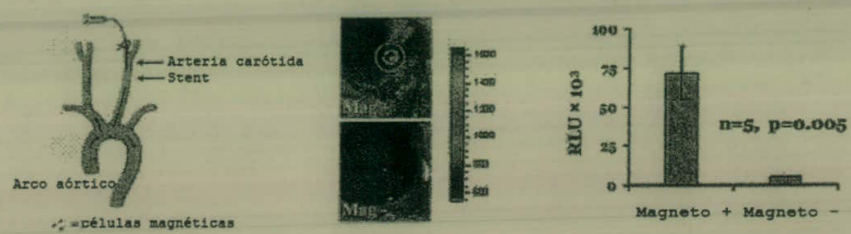
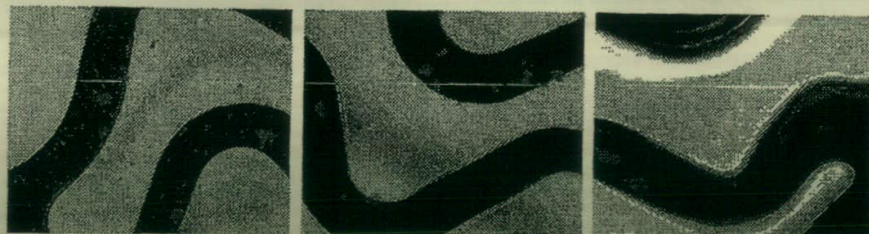


Fig. 16G

Mag + (1.5T)



Mag -



Fig. 17

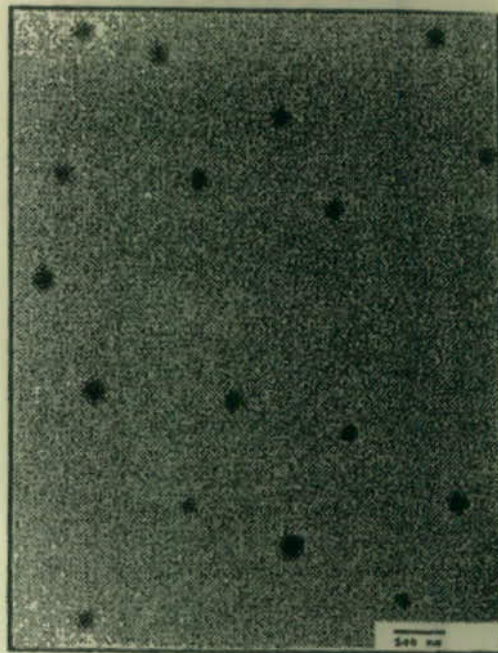


Fig. 18A

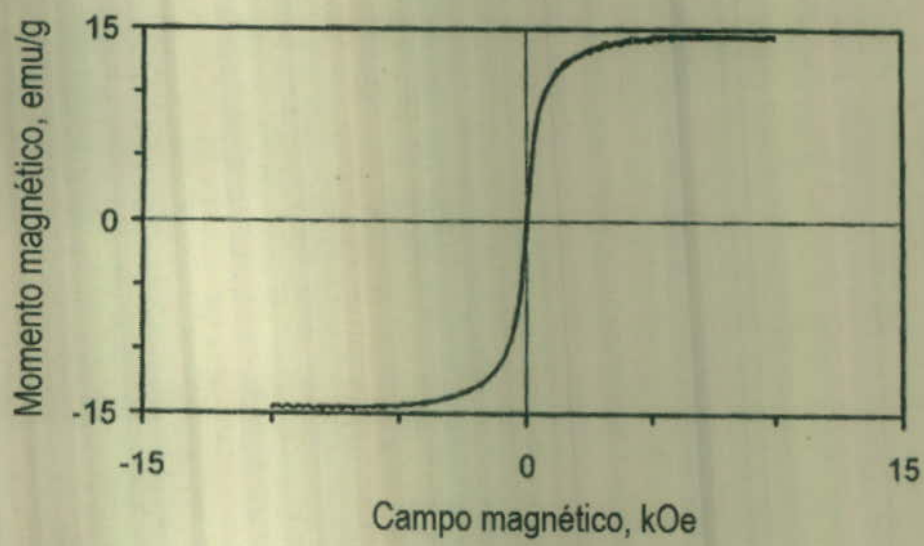
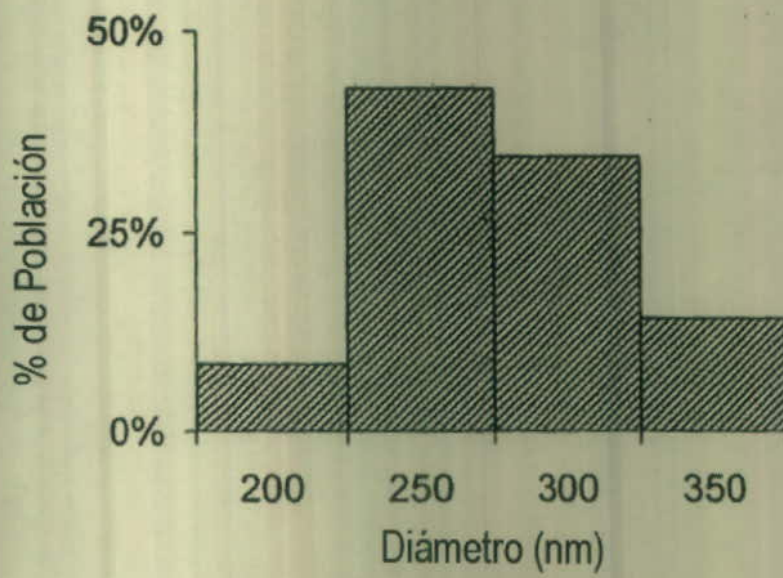
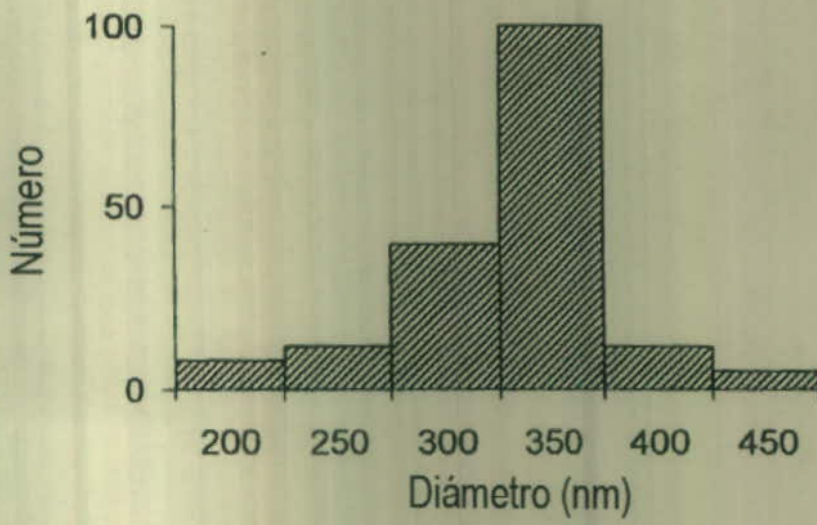


Fig. 18B

**Fig. 18C****Fig. 18D**

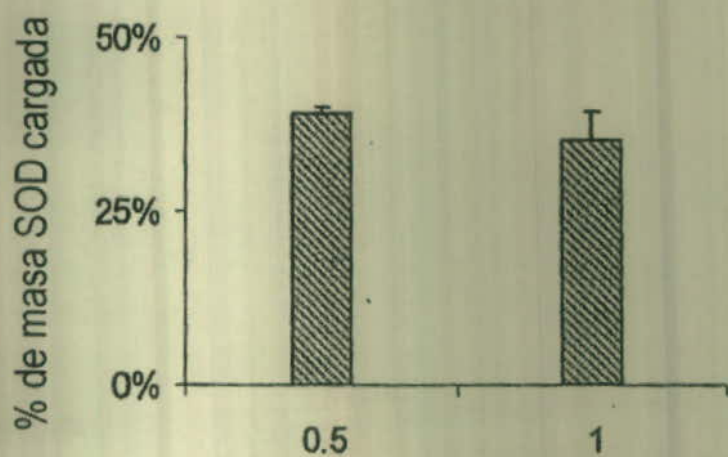


Fig. 19A

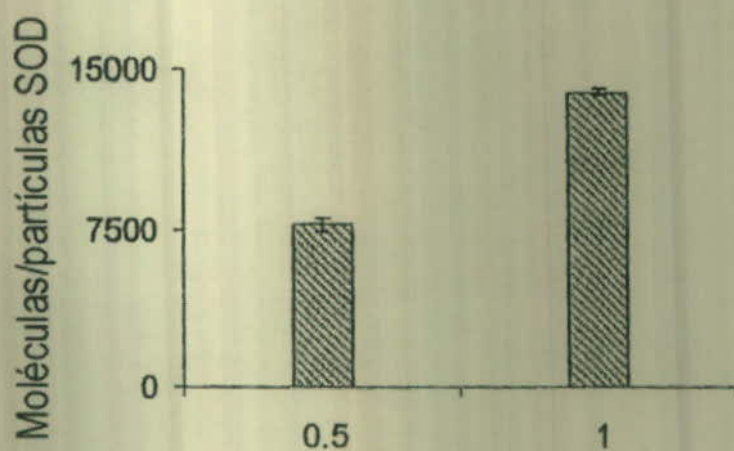


Fig. 19B

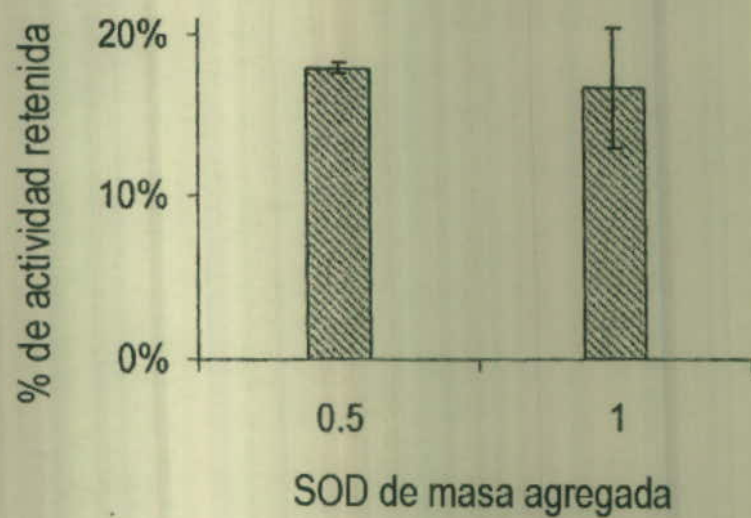
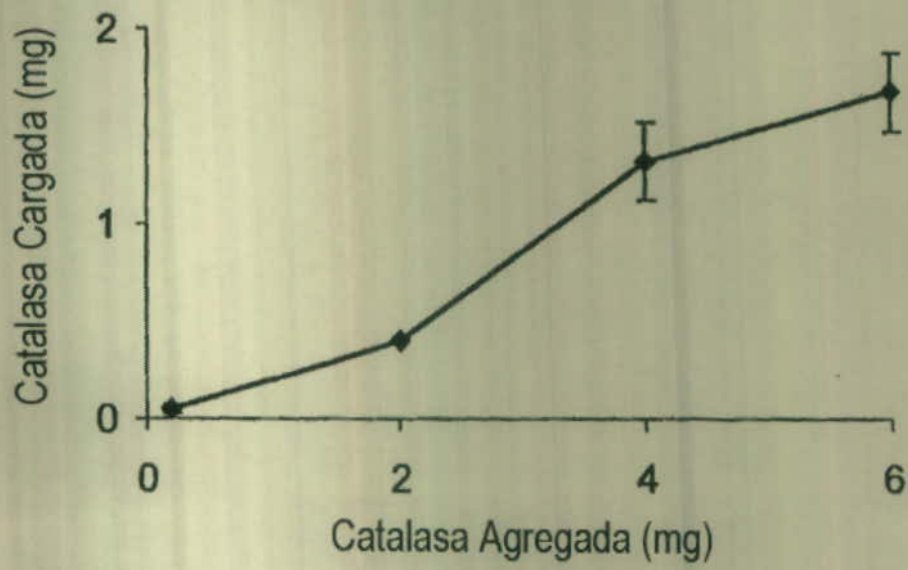
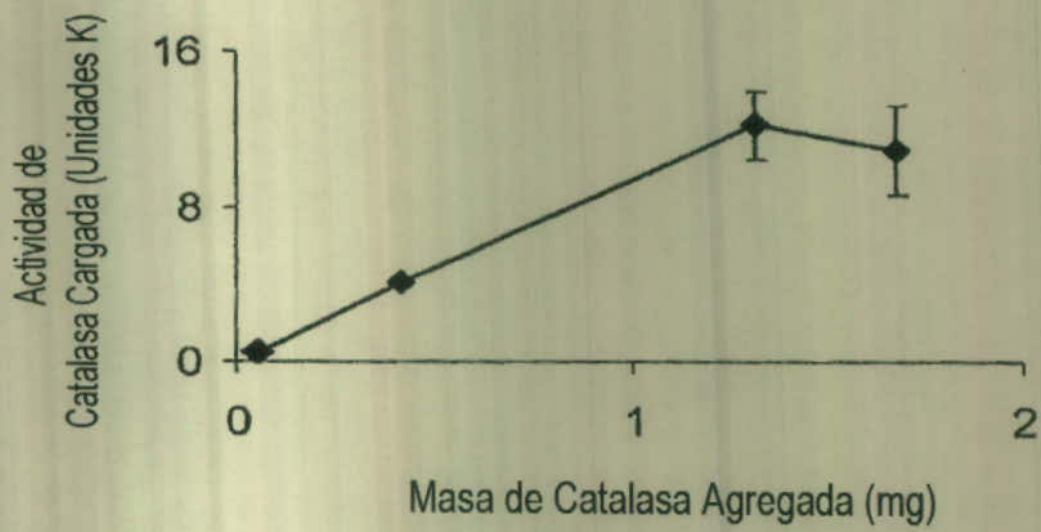


Fig. 19C

**Fig. 20A****Fig. 20B**

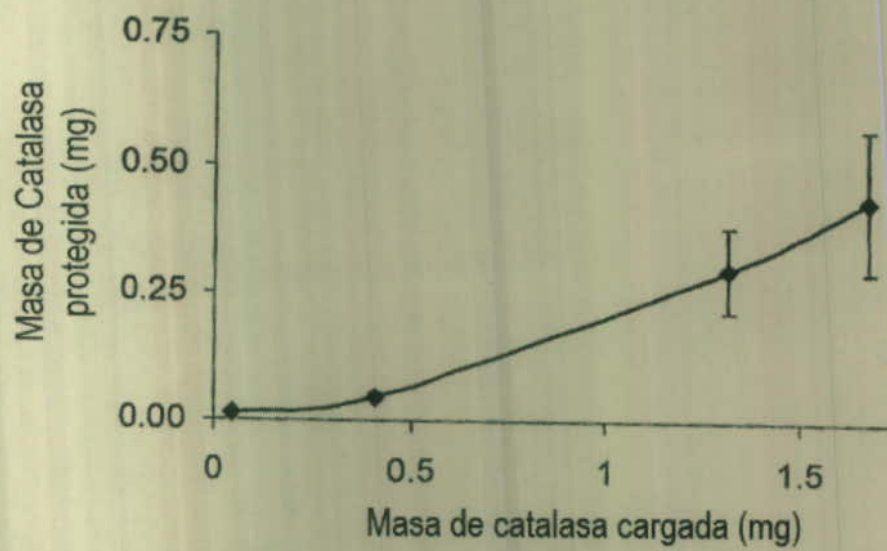


Fig. 21A

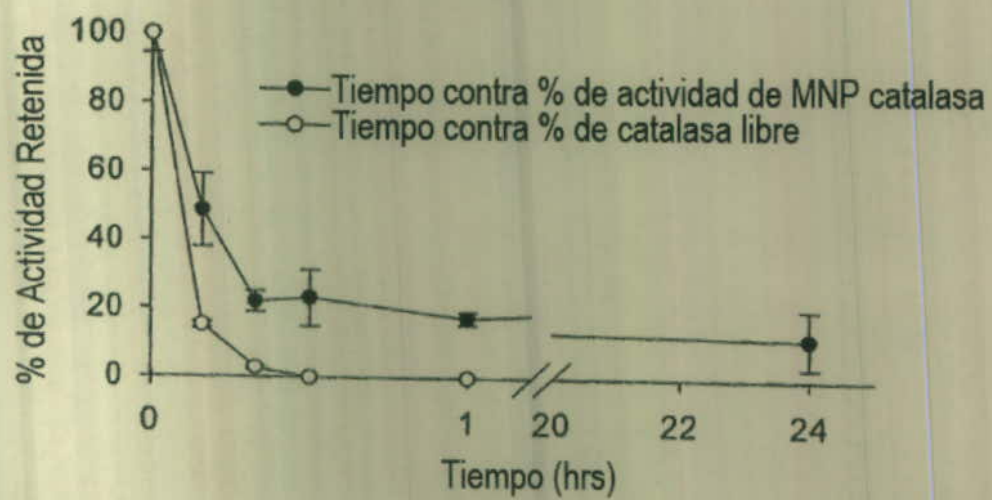


Fig. 21B

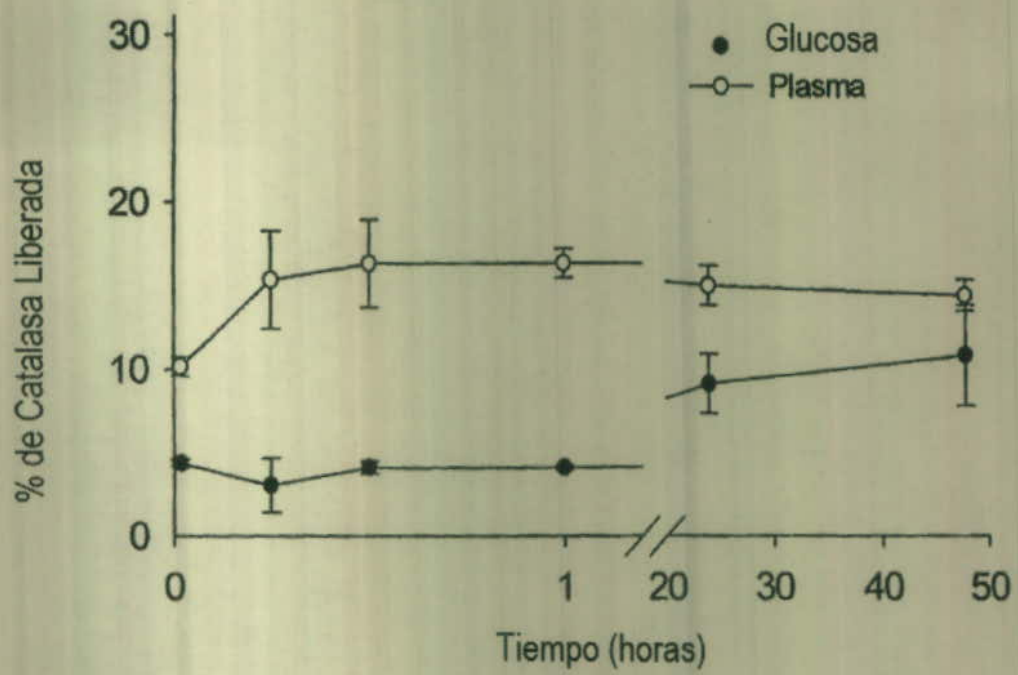


Fig. 22

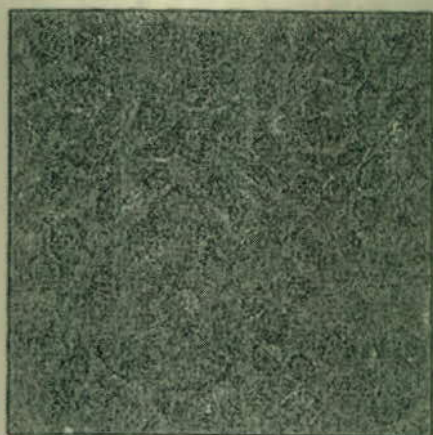


Fig. 23A

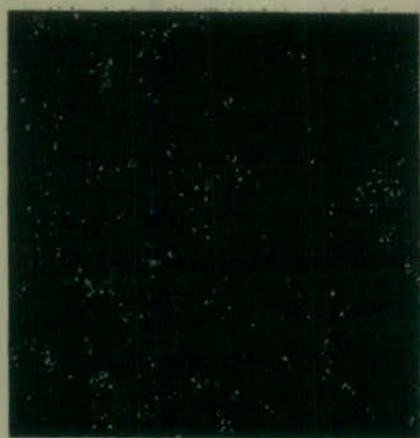


Fig. 23B

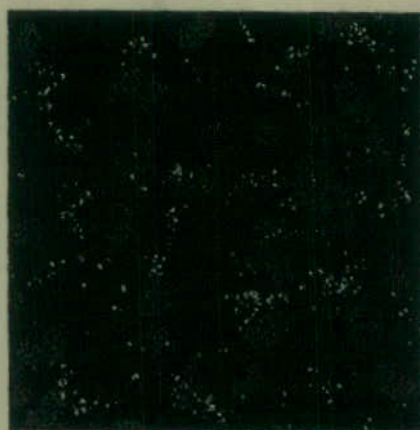


Fig. 23C

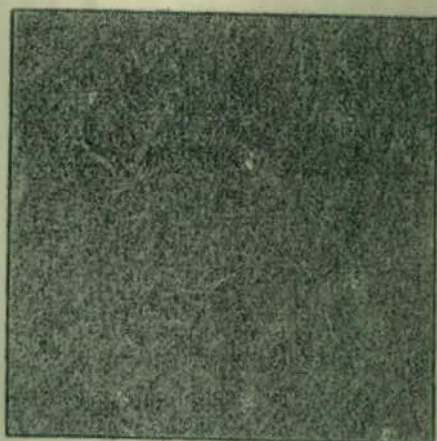


Fig. 23D

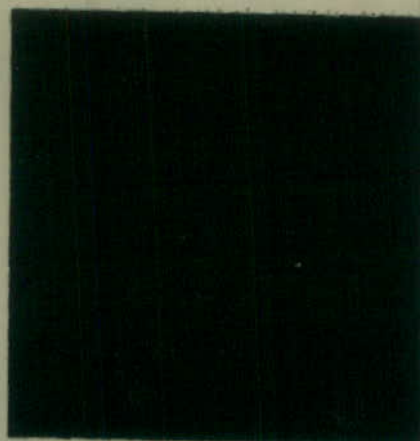


Fig. 23E

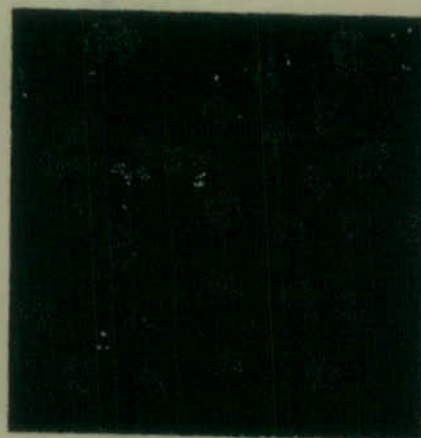


Fig. 23F

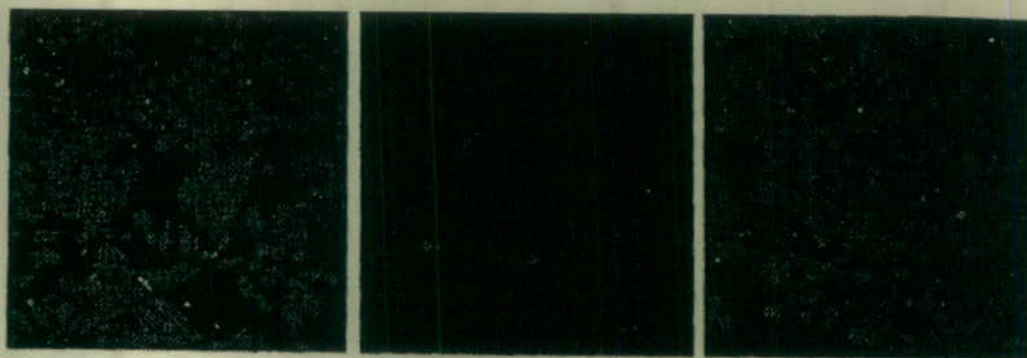


Fig. 24A

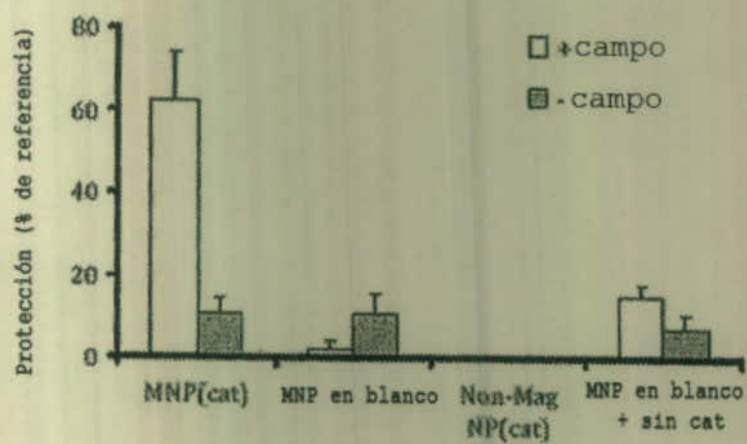


Fig. 24B

Fig. 25A PREPARACION DE FERRO-FLUIDO

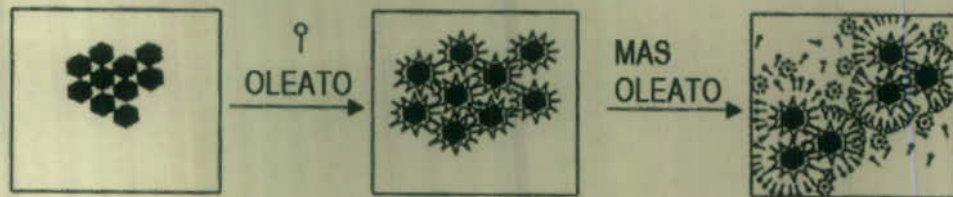
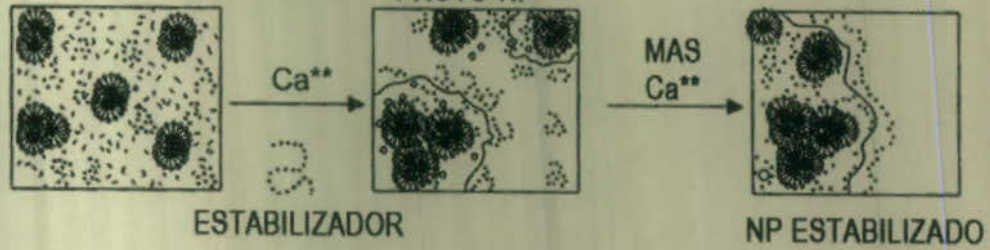


Fig. 25B FORMACION DE MNP



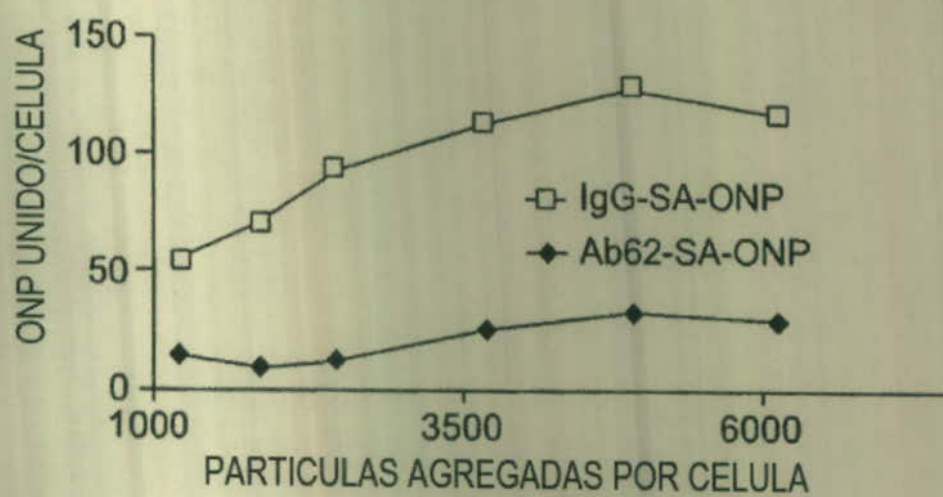
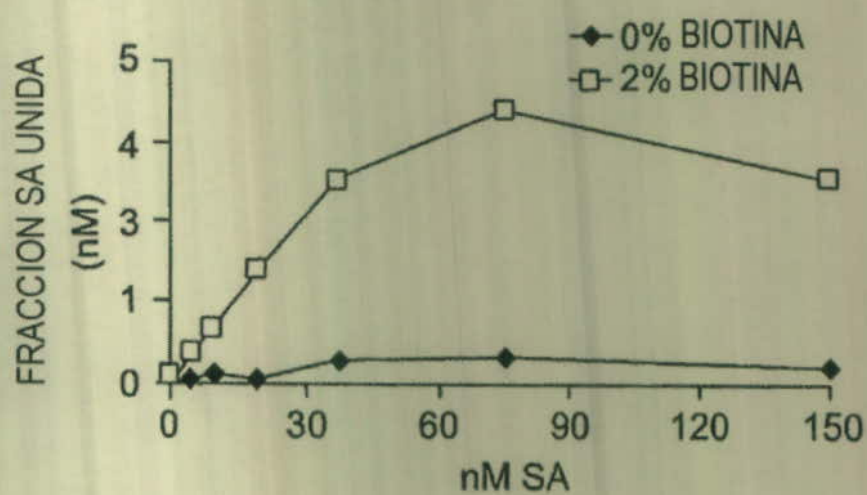


Fig. 26

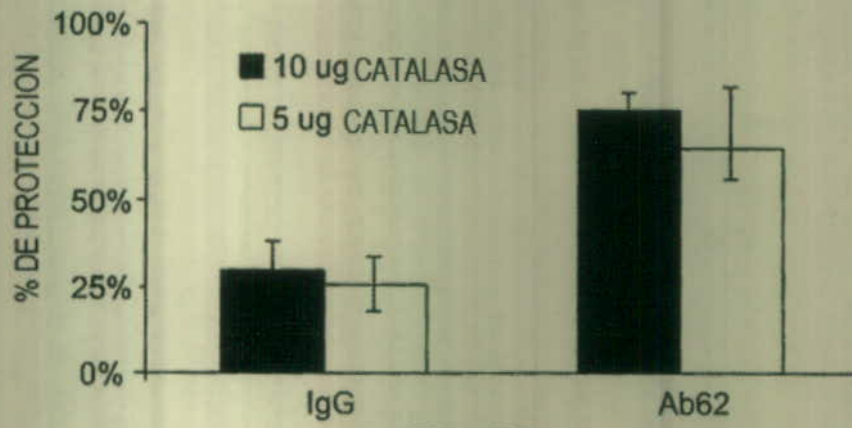


Fig. 27

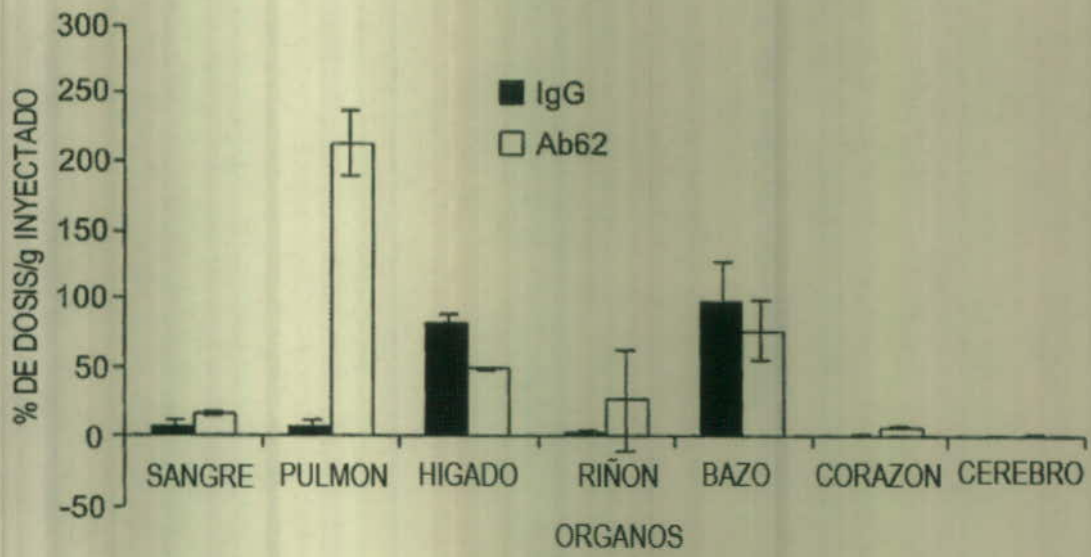
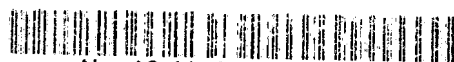


Fig. 28



No. 12-116675- -00000-0000

Fecha: 2012-07-11 16:25:16 Dep: 2020 DIR NUEVASOR  
Tra: 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL I  
Act: 411 PRESENTACION Folios: 154Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 163

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☐MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                              |                                                                                                                          |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal, como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>                     | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                         |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                      |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                      |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |