

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 400**

21 Número de solicitud: 201831064

51 Int. Cl.:

C01G 49/08	(2006.01)	A61B 5/055	(2006.01)
B82Y 30/00	(2011.01)		
B82Y 40/00	(2011.01)		
A61K 47/02	(2006.01)		
A61K 38/16	(2006.01)		
A61K 31/704	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61K 49/18	(2006.01)		

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

02.11.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.05.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.12.2020

Fecha de concesión:

13.01.2021

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.01.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. HOSPICIO S/N
18071 GRANADA (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**JIMÉNEZ LÓPEZ, Concepción;
VALVERDE TERCEDOR, Carmen;
PEIGNEUX NAVARRO, Ana;
JABALERA RUZ, Ylenia María;
PRAT, María y
OLTOLINA, Francesca**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS MEDIADAS POR MAMC**

ES 2 758 400 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 758 400**

21 Número de solicitud: 201831064

57 Resumen:

Nanopartículas magnéticas biomiméticas que comprenden MamC.

La presente invención proporciona nanopartículas biomiméticas superparamagéticas que comprenden magnetita, las cuales se pueden fabricar mediante un proceso escalable. Además, estas nanopartículas presentan unas prometedoras propiedades, ya que, si se funcionalizan, pueden convertirse en transportadores de fármacos o agentes de contraste para la obtención de imágenes clínicas. Se pueden usar en entornos clínicos también para purgar médula ósea, así como separadores de moléculas y/o en aplicaciones medioambientales como biosensores. Estas nanopartículas, acopladas con un fármaco, se pueden encapsular en liposomas, obteniendo magnetoliposomas, los cuales pueden funcionalizarse para su uso en la administración/liberación dirigida de fármacos. Además, las mezclas de magnetoliposomas (tanto funcionalizados como sin funcionalizar con un agente de direccionamiento) y nanopartículas magnéticas biomiméticas funcionalizadas o liposomas que contengan mezclas de BMNPs funcionalizadas y MNPs pueden usarse para combinar diferentes tratamientos como, por ejemplo, la administración/liberación dirigida de fármacos y la hipertermia.

ES 2 758 400 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

NANOPARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS MEDIADAS POR MAMC

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención trata de composiciones que integran nanopartículas magnéticas biomiméticas. Las nanopartículas magnéticas pueden usarse como medicamento, en particular como un medicamento para tratamientos de enfermedades con un marcador asociado que puede ser reconocido, como por ejemplo, cáncer.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

La Nanotecnología, y en particular la producción de nanopartículas magnéticas (MNPs) generan millones de dólares cada año en EEUU. La aplicación nanotecnológica se basa en el hecho de que éstas se pueden manipular fácilmente mediante la aplicación de un campo magnético externo y, por tanto, se pueden dirigir hacia el sitio diana mediante un controlador externo (Arakaki et al., 2014; Prozorov et al., 2013). Hasta la fecha, estas partículas se usan en numerosas aplicaciones que van desde ferrofluidos y almacenamiento magnético hasta el área clínica/científica como la detección de polimorfismos de nucleótidos (Maruyama et al., 2004, 2007; Matsunaga et al., 2007), separación celular (Matsunaga et al., 2007), aislamiento y purificación de ADN (Ota et al., 2006), agentes de contraste de imagen en resonancia magnética (Lisy et al., 2007), diagnóstico temprano, transportadores de drogas para una quimioterapia dirigida (Sun et al., 2008) y tratamientos hipertérmicos contra el cáncer, entendiéndose por eso el daño térmico que induce la rotación de las nanopartículas localizadas (Alphandéry et al., 2011).

Para estas aplicaciones, especialmente en clínica, uno de los requerimientos más importantes es que las MNPs usadas como nanotransportadores respondan lo más eficientemente posible al campo magnético externo que se aplica para guiar/concentrar a dicho nanotransportador al sitio diana (Prozorov et al., 2013). Esta respuesta depende del momento magnético por partícula, el cual, para nanopartículas magnéticas de magnética estequiométrica superparamagnéticas y cristalinas, depende del tamaño de la MNP. Para magnetita, el tamaño

ideal de la nanopartícula para integrar un solo dominio magnético está entre 30 y 120 nm. La mayoría de las nanopartículas superparamagnéticas ya comercializadas son pequeñas (< 30 nm) y, por tanto su momento magnético se podría incrementar si se usaran MNPs más grandes. Por encima de 120 nm las nanopartículas magnéticas son multidominios y su momento magnético no es estable y depende de cómo se orienten estas nanopartículas. El tamaño es también importante cuando entran en juego los tratamientos de hipertermia. De hecho, el poder de calentamiento generado por unidad de masa de partícula ocasionado por la aplicación de un campo magnético alterno externo está relacionado directamente con la cantidad de hierro en la MNP, y éste debe ser lo más alto posible para mantener el campo magnético aplicado dentro de los rangos aceptados en clínica y una dosis baja de MNPs. Más aún, las nanopartículas magnéticas que se van a usar en clínica deben ser también biocompatibles y no conllevar ningún riesgo asociado a las dosis que se necesitan aplicar. Otro requerimiento importante de las MNPs es que éstas expongan grupos funcionales en su superficie que permitan la funcionalización/liberación de fármacos basados en estímulos externos tales como cambios en el pH del ambiente. Con este objetivo, la mayoría de las MNPs comerciales se recubren de compuestos tales como polietilenglicol y ácidos orgánicos. Este procedimiento no sólo introduce pasos adicionales en el proceso de producción de las MNPs (obviamente incrementando el tiempo de preparación y los costes totales), sino que también dicho recubrimiento puede apantallar el núcleo magnético e interferir con la respuesta magnética de la nanopartícula frente a un campo magnético externo aplicado (respuesta que ya es subóptima por su pequeño tamaño). Por tanto, la mayoría de las MNPs comerciales tienen problemas que son necesarios solucionar para que estas MNPs puedan ser nanotransportadores eficientes.

La magnetita (óxido de Fe^{2+} y Fe^{3+} , Fe_3O_4) es un mineral que se encuentra en numerosos ambientes, desde rocas ígneas y metamórficas, a toda clase de sedimentos, tanto terrestres como extraterrestres (Thomas-Keprta et al., 2000). También se ha encontrado en organismos superiores, como aquellos que presentan un comportamiento migratorio y los quitones. Inorgánicamente, la magnetita se puede formar como una fase primaria a partir de una solución que contiene Fe^{2+} y/o Fe^{3+} (método de coprecipitación y óxido-reducción) a la que se le sube el pH por adición de compuestos químicos (Arató et al., 2005; Perez-Gonzalez et al., 2010; Prozorov et al., 2007; Schwertmann and Cornell, 2000). Éste es el método más empleado para producir nanopartículas magnéticas. Es relativamente fácil de hacer, las nanopartículas se producen a temperatura ambiente y se pueden obtener grandes cantidades de material por lote. La principal desventaja es que estas nanopartículas son habitualmente

pequeñas (<30 nm) y, por tanto, tienen un momento magnético por partícula pequeño, lo que incrementa las dosis a usar, lo que puede suponer un riesgo.

5 Las magnetitas también se pueden formar mediante la transformación de precursores, normalmente a altas temperaturas (Jimenez-Lopez et al., 2012). Una ventaja es que se pueden formar magnetitas cúbicas y bien cristalizadas. Sin embargo, una desventaja importante es que este protocolo es muy caro y es difícil controlar el tamaño de las nanopartículas, Las nanopartículas de magnetita obtenidas por este proceso son normalmente o muy pequeñas (< 30 nm) o multidominios (> 120 nm).

10

También la magnetita se puede formar biológicamente, bien mediante un proceso de biomineralización inducida (BIM) o de biomineralización controlada (BCM) (Bazylinski and Frankel, 2004). La formación de magnetita BIM es el resultado de la actividad metabólica de los organismos y de las subsecuentes reacciones químicas que se producen mediadas por los productos metabólicos. Los minerales originados mediante BIM son indistinguibles de los formados inorgánicamente en esas condiciones (Perez-Gonzalez et al., 2000). Estas nanopartículas BIM no se usan habitualmente en aplicaciones nanotecnológicas.

15

Por el contrario, las nanopartículas de magnetita formadas por bacterias magnetotácticas son resultado de un proceso de biomineralización exquisitamente controlado a nivel genético (BCM), lo que hace que estas partículas sean la nanopartícula magnética ideal. Son ideales porque presentan unas características muy específicas como estructuras cristalinas perfectas, alta pureza química, morfologías de no equilibrio y una distribución estrecha de tamaños (Bazylinski y Frankel, 2004), lo que hace que estos cristales sean un dominio único magnético y tengan unas propiedades magnéticas previsibles y estables (Amemiya et al., 2007; Prozorov et al., 2013). Además, otra ventaja es que son biocompatibles. Por lo tanto, existe una gran demanda de estas nanopartículas, especialmente en clínica.

20

25

Sin embargo, estas nanopartículas no se pueden comercializar porque el cultivo de las bacterias magnetotácticas no puede escalarse debido a que crecen muy lentamente y a que tienen unos requerimientos nutricionales muy exigentes. Para solucionar este problema se están explorando diferentes alternativas con el objetivo de mejorar los rendimientos de producción de nanopartículas parecidas a los magnetosomas. Básicamente se siguen tres estrategias. La primera es intentar transformar microorganismos poco fastidiosos no magnetotácticos en bacterias magnetotácticas. En este sentido cabe destacar el trabajo de Kolinko et al. (2014). Estos autores demostraron, por primera vez, que la inserción de genes

35

específicos de *Magnetospirillum gryphiswaldense* en *Rhodospirillum rubrum* hizo que esta última produjera magnetosomas heterólogos. También demostraron que cuando se silenciaban en *Rhodospirillum* genes implicados en la producción de estos magnetosomas heterólogos, las alteraciones que se producían eran comparables a las que se producían en *M. gryphiswaldense*. Con este trabajo tan importante, estos autores abrieron la puerta al escalado de magnetosomas heterólogos en microorganismos más fáciles de cultivar. Sin embargo, aunque prometedor, la estabilidad del mutante y la viabilidad del escalado de estos magnetosomas heterólogos aún no se ha demostrado y los autores no exploraron estos aspectos.

10

La segunda alternativa es usar tecnología de ADN recombinante para silenciar o sobreexpresar genes de interés en cepas determinadas. En este sentido ya existe una patente US2010/0292495 A1 que pretende obtener nanopartículas recombinantes de magnetita controlando la expresión de *mamG*, *mamF*, *mamD*, and *mamC* genes en bacterias magnetotácticas.

15

Finalmente la tercera alternativa es la aproximación biomimética, es decir, aprender de la naturaleza, la cual puede inspirar nuevas estrategias para producir materiales funcionales avanzados. Así, con el objetivo de producir químicamente cristales parecidos a los magnetosomas cuya producción pueda ser escalada, algunas proteínas del magnetosoma, tanto proteínas completas expresadas como recombinantes como péptidos sintéticos, se han probado en experimentos de producción de magnetita *in vitro*. Gracias a la mediación de estas proteínas se han obtenido nanopartículas de magnetita con diferentes propiedades magnéticas a las de precipitación química inorgánica. En este sentido, la mayor parte del trabajo realizado hasta el momento ha sido la obtención *in vitro* de nanopartículas de magnetita usando la proteína entera Mms6 de diversas especies de *Magnetospirillum* (Arakaki et al., 2010, 2014; Amemiya et al., 2007; Prozorov et al., 2007; Galloway et al., 2012; Bird et al., 2016). La mayoría de las nanopartículas magnéticas obtenidas por mediación de esta proteína son superparamagnéticas de un tamaño de alrededor de 20 nm. Por tanto, no mejoran demasiado las nanopartículas comerciales que ya existen en el mercado. Mediante la técnica del biomolde (biotemplating) se consiguen nanopartículas más grandes con Mms6 (Galloway et al., 2012b; Bird et al., 2016), pero las propiedades magnéticas de estas nanopartículas no se han estudiado y su escalado tampoco se ha abordado, pero es muy probablemente difícil y bastante caro. La proteína MmsF de *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 es otra potencial candidata a mediar la formación *in vitro* de nanopartículas biomiméticas de magnetita de tamaños entre 80-90 nm (Rawlings et al., 2014). Estas

35

nanopartículas podrían ser de dominio único magnético, pero las propiedades magnéticas de estas nanopartículas no se han estudiado y no se han caracterizado lo suficiente como para determinar si estas nanopartículas podrían ser útiles en nanotecnología. De todas formas, todos estos experimentos se han hecho usando una sola proteína recombinante en la solución acuosa en la que se forma la magnetita.

Nanopartículas biomiméticas se han producido también usando quimeras construidas con péptidos sintéticos de proteínas del magnetosoma unidas a proteínas de fusión (Nudelman et al., 2016 y 2018). Algunos de éstos péptidos se han patentado ya (WO 2017153996). Cuando se usan péptidos del bucle de MamC se obtienen nanopartículas más grandes que aquellas que se producen en presencia de otros péptidos o en ausencia de péptidos. Sin embargo, la distribución de tamaños de las nanopartículas, y, por tanto, su heterogeneidad, era mayor que la de las nanopartículas producidas en presencia de la proteína entera MamC expresada como recombinante.

El equipo de investigación de la Prof. Jimenez-Lopez ha hecho importantes avances en la producción de nanopartículas biomiméticas. De hecho, es el único grupo que trabaja con MamC de *Magnetococcus marinus* MC-1, que es la proteína más abundante del magnetosoma en la mayoría de las bacterias magnetotácticas. Además, este grupo es el único que ha expresado y purificado como proteínas recombinantes las tres proteínas que controlan el tamaño y la morfología de los magnetosomas de MC-1 (MamC, Mms6 y Mms7). MamC de *Magnetococcus marinus* MC-1 ha resultado ser una candidata fuerte para producir nuevas nanopartículas biomiméticas (BMNPs). Éstas son mayores (~40 nm) que la mayoría de las MNPs comerciales (≤ 30 nm) y presentan (1) mayor temperatura de bloqueo, siendo superparamagnéticas a temperatura ambiente, (2) un incremento más lento de la magnetización con la temperatura y (3) temperatura de transición de Verwey. Todas estas características son compatibles con nanopartículas con mejor estructura cristalina y con un mayor momento magnético por partícula comparadas con otras nanopartículas inorgánicas y/o con la mayoría de nanopartículas mediadas por Mms6. Estas características las hacen comportarse como si fueran no magnéticas a temperatura ambiente en ausencia de un campo magnético externo, lo cual previene aglomeración, mientras que responden eficientemente cuando se aplica un campo magnético externo, por lo tanto aumentando la eficacia de la guía magnética. Más aún, resultados previos del grupo mostraron que MamC confiere nuevas propiedades superficiales a las BMNPs, en concreto, un punto isoeléctrico (iep) a un pH de 4,4. Esto es importante porque las BMNPs están negativamente cargadas a pH fisiológico y se pueden funcionalizar con moléculas, como la doxorubicina (DOXO), que están

positivamente cargadas a ese pH, mediante interacciones electrostáticas. Más aún, cuando el pH decrece (algo que ocurre de manera natural en el microambiente tumoral), esa interacción electrostática se debilita y la molécula se libera de la BMNP. Estas BMNPs son citocompatibles y biocompatibles. Las propiedades de las nanopartículas resultantes dependen del tipo de proteína introducida en la solución antes de la formación de dicha nanopartícula y/o la concentración relativa de las diferentes proteína(s) usada(s).

Sin embargo, el proceso de formación de nanopartículas biomiméticas de magnetita usando MamC deriva en la formación de siderita [Valverde-Tercedor et al., 2015 (magnetita >90% + siderita <10%)] o goetita [Lopez-Moreno et al., 2017 (magnetita 85% + goetita 15%)] como producto no deseado. Una vez que se producen y debido a su tamaño nanométrico, estas fases minerales (siderita y/o goetita) son muy difíciles, si no imposible, de eliminar de la mezcla. Por lo tanto, es necesario un método para producir únicamente magnetita y no otras fases. Además, es necesario desarrollar una composición que integre una fase mineral sustancialmente pura de nanopartículas de magnetita ($\geq 95\%$) donde las nanopartículas resultantes sean superparamagnéticas, de dominio único magnético y tengan propiedades superficiales que permitan su funcionalización con moléculas diferentes sin la necesidad de un tratamiento posterior a los procesos de producción.

Las nanopartículas pueden verse como eficientes nanotransportadores de medicamentos especialmente cuando se funcionalizan con moléculas (anticuerpos, aptámeros ligados de receptores celulares superficiales) capaces de reconocer determinados marcadores ligados a una enfermedad. Esto posibilita el alcanzar grandes cantidades locales de medicamento y baja exposición sistémica, por lo tanto se reduce la toxicidad del tratamiento aumentando su eficacia (Brigger et al., 2001; De Jong and Borm, 2008; Singh and Lillard, 2009).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: CLUSTAL O (1.2.1) alineamiento múltiple de secuencias de Mms6 en diferentes bacterias magnetotácticas.

Figura 2: Gel SDS-PAGE de MamC purificada (carril 3) y Mms6 (carril 5). Lisados de *E. coli* TOP10 antes de la Purificación de MamC (carril 2) y Mms6 (carril 4). Carril 1, marcador de pesos moleculares (KDa).

Figura 3: Cristales de magnetita sintetizados en presencia de MamC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (BMNPs): (A) Imágenes TEM, (B) Distribución del tamaño del cristal. Detalle: Modelización de BMNPs a partir de datos de HRTEM usando SHAPE v7.3 Cristales de magnetita sintetizados en ausencia de proteína (magnetita inorgánica: MNPs): (C) Imágenes TEM, (D) Distribución del tamaño del cristal.

Figura 4: Imágenes HRTEM de nanopartículas inorgánicas de magnetita (A y B) y nanopartículas magnéticas producidas en presencia de MamC (C, D y E). Las líneas de puntos representan las caras cristalinas y las líneas representan las direcciones cristalográficas.

Figura 5: Imágenes HRTEM de nanopartículas magnéticas producidas en presencia de Mms6 (A y B) y nanopartículas magnetitas producidas en presencia de MamC y Mms6 (C y D). Las líneas de puntos representan las caras cristalinas y las líneas representan las direcciones cristalográficas.

Figura 6: (A) Potencial ζ de las MNPs y BMNPs, (B) Análisis termogravimétricos de MNPs y BMNPs, (C) Ciclo de histéresis de BMNPs y MNPs a 300 K, (D) ZFC-W y FC-C de MNPs y BMNPs. La temperatura de bloqueo (T_B) y temperatura de irreversibilidad (T_{irr}) se indican en la figura para cada muestra.

Figura 7: Isoterma de adsorción de Doxorubicina (DOXO) (A: cinética; B: adsorción en función de la dosis. Se alcanza la saturación a 1 mmol DOXO por gramo de nanopartículas) y de anticuerpo monoclonal DO-24 (C) en nanopartículas de magnetita.

Figura 8: Perfil de desorción de DOXO.

Figura 9: Efecto de las nanopartículas biomiméticas no funcionalizadas y de las nanopartículas ternarias (funcionalizadas con Doxorubicina [DOXO] y con el anticuerpo monoclonal DO-24) sobre la viabilidad de las células tumorales humanas que expresan el receptor Met, Met/HGF-R+ GTL-16, y que no expresan el receptor Met, Met/HGF-R- Huh7. Las nanopartículas no funcionalizadas reducen la viabilidad celular sólo hasta un 95%. DOXO [$\mu\text{g}/\text{ml}$] indica la concentración de DOXO en cada muestra y los datos expresan la viabilidad celular comparada con un control (no tratado) en el mismo intervalo de tiempo. A concentraciones de DOXO de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las nanopartículas ternarias eran significativamente mucho más tóxicas para GTL-16 que para Huh7 comparadas con las nanopartículas sin

funcionalizar. La viabilidad celular se midió mediante un test MTT después de tres días de tratamiento.

Figura 10: Toxicidad en tiempo real de las nanopartículas biomiméticas sin funcionalizar, nanopartículas binarias MNPs (DOXO-MNPs, -----) y nanopartículas ternarias (——) sobre células Met/HGF-R+ GTL-16 y Met/HGF-R- Huh7. La presencia de DO-24 mAbs incrementa significativamente la toxicidad de las nanopartículas ternarias comparadas con la de las binarias en células GTL-16, mientras que no se observaron diferencias en aquellas que no expresaban el receptor Met (Huh7). Estos ensayos se hicieron con XCELLIGENCE.

10

Figura 11: Análisis histológico de diferentes órganos de ratones BALB/c hembras a las que se les habían inyectado de manera intravenosa nanopartículas biomiméticas (10 µg/ g ratón). Los ratones se sacrificaron a tiempos diferentes tras la inyección (1h, 4h, 1d, 7d y 60d) y se procesaron los órganos mediante tinción de azul de Prusia y Hematoxilina-Eosina. Se detectaron cantidades pequeñas de hierro en los pulmones que disminuyó a los 60 días. En el bazo, que normalmente contiene hierro, se incrementaron los niveles de hierro a la hora de la inyección, que después disminuyó durante los días siguientes, para después recuperarse a niveles normales a los 60 d. En los otros órganos (cerebro, corazón, hígado y riñones) se detectó un ligero aumento de hierro durante el primer día que disminuyó posteriormente. Las nanopartículas biomiméticas son muy biocompatibles *in vivo*.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención trata de un método para producir una composición que es substancialmente una fase mineral pura de magnetita biomimética superparamagnética (BMNPs, $\geq 95\%$ del sólido total) que engloba los siguientes pasos: **(a)** preparar una solución de carbonato, **(b)** añadir FeCl_3 a la solución de carbonato, **(c)** añadir MamC y, opcionalmente, Mms6 a la solución obtenida en el paso (b), **(d)** incubar la solución obtenida en el paso (c) durante, al menos, 30 minutos, **(e)** añadir $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ a la solución obtenida en el paso (d), y **(f)** ajustar el pH de la solución obtenida en el paso (e) a 9 usando una base; este método se lleva a cabo a 25 °C y 1 atmósfera de presión y todas las soluciones de desoxigenan previamente. En este método antes mencionado, las concentraciones de los reservorios de proteínas deben estar en el siguiente rango: [MamC] 2-5 mg/mL, [Mms6] y [Mms7] > 1 mg/mL.

35

Además, la presente invención aporta una composición que engloba: (i) una fase mineral substancialmente pura de magnetita superparamagnética, (ii) MamC, y (iii) opcionalmente, Mms6; donde, al menos los componentes (i) y (ii) forman nanopartículas magnéticas superparamagnéticas que contienen hasta 5% en peso de MamC (MamC-mediadas BMNPs se componen entonces de ~95% en peso de magnetita y ~5% en peso de MamC), con un tamaño medio de partícula entre 30-120 nm, punto isoeléctrico de ~4,4, área superficial de ~90 m²/g, temperatura de bloqueo de ~145 °K y temperatura de irreversibilidad de ~292 °K. Además, la presente invención proporciona una formulación para hacer magnetoliposomas que engloba: (i) la composición de la presente invención, (ii) un agente que forma liposomas, y (iii) opcionalmente magnetitas inorgánicas superparamagnéticas.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que engloba la composición de la presente invención o la formulación de los magnetoliposomas de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable y/o diluyente. La composición de la presente invención, la formulación de los magnetoliposomas o la composición farmacéutica se pueden usar como medicamento. En particular, la composición de la presente invención, la formulación de los magnetoliposomas o la composición farmacéutica se pueden usar en tratamientos contra el cáncer.

Para terminar, la presente invención también aporta el uso de la composición de la presente invención, la formulación de los magnetoliposomas o la composición farmacéutica de la presente invención para la preparación de agentes de contraste para técnicas clínicas basadas en imagen. La presente invención también aporta el uso de la composición de la presente invención para el (i) aislamiento de ácidos nucleicos; (ii) como separador molecular; (iii) como biosensores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Definiciones

Los términos "tratamiento" y "terapia", usados en esta memoria se refieren a un conjunto de protocolos higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos que se usan con la intención de curar y/o aliviar una enfermedad y/o los síntomas con el objetivo de mejorar el estado de salud.

35 Los términos "tratamiento" y "terapia" incluyen métodos preventivos y curativos, ya que ambos están destinados al mantenimiento o restablecimiento de la salud de un individuo o de un

animal. Independientemente del origen de los síntomas, enfermedad o minusvalía, la administración de un medicamento apropiado para aliviar o curar un problema de salud se debe interpretar como una forma de tratamiento terapia en el contexto de esta memoria.

- 5 El término "cantidad terapéutica efectiva" se refiere a la cantidad de compuesto en una composición o formulación que tiene un efecto terapéutico que es capaz de tratar la enfermedad.

Tal y como está usado aquí, "transportador farmacéuticamente aceptable" o "diluyente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera y todos los solventes, medios dispersos, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción compatibles con administración farmacéutica. El uso de estos medios y agentes como sustancias farmacológicamente activas es bien conocido. Los transportadores, excipientes o estabilizantes aceptados no son tóxicos para el sujeto a la dosis y concentración
15 empleadas y, sin que limite el ámbito de la presente invención, incluyen: agentes tamponadores; preservantes; co-solventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables como poliésteres; contraiones formadores de sales como sodio, alcoholes-azúcares polihídricos, aminoácidos como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-phenylalanina, ácido glutámico y
20 treonina; azúcares orgánicos o azúcares alcohólicos como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinisol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre como urea, glutation, ácido tioctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol, y tiosulfato sódico; proteínas de bajo peso molecular como albumina del suero sanguíneo humano, albumina del suero sanguíneo bovino, gelatina, u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona. Otros transportadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th
25 edition, Osol, A. Ed. (1980) pueden también estar incluidos en la composición farmacéutica descrita aquí, contando con que no afecten negativamente a las características de la
30 composición farmacéutica.

El término "agente terapéutico" se refiere a cualquier sustancia que puede usarse para tratar y/o prevenir una enfermedad cuando se usa en cantidades terapéuticamente efectivas. El
35 agente terapéutico puede ser una molécula química pequeña (como, por ejemplo,

doxorrubicina, antihistamina, etc.), o biológica (por ejemplo, proteína terapéutica) y/o ácido nucleico (por ejemplo, siARN, gARN para CRISPR/Cas9, etc.).

El término “agente quimioterapéutico” se refiere a cualquier droga que puede usarse para
 5 tratar o prevenir cáncer. Ejemplos no-limitantes incluyen: Actinomicina. Todos los ácidos
 retinoicos -trans, Azacitidina, Azatioprina, Bleomicina, Bortezomib, Carboplatino,
 Capecitabina, Cisplatino, Clorambucilo, Ciclofosfamida, Citarabina, Daunorubicina,
 Docetaxel, Doxifluridina, Doxorrubicina, Epirubicina, Epozilona, Etopósido, Fluorouracilo,
 Gemcitabina, Hidroxiurea, Idarrubicina, Imatinib, Irinotecan, Mecloretamina, Mercaptopurina,
 10 Metotrexato, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pemetrexed, Teniposida, Tioguanina,
 Topotecan, Valrubicina, Vemurafenib, Vinblastina, Vincristina, Vindesina y Vinorelbina.

El término “cáncer” se refiere a un grupo de enfermedades que pueden definirse como un
 nuevo crecimiento anormal, benigno o maligno, de tejido que no posee función fisiológica y
 15 que surge a partir de una proliferación celular incontrolada y habitualmente rápida y que tiene
 el potencial de invadir o extenderse a otras partes del cuerpo. La composición y la formulación
 del magnetoliposoma de la presente invención puede reconocer de manera específica células
 cancerígenas mediante la funcionalización con una sustancia señalizadora y puede llevar
 agentes antiproliferantes a tumores sólidos o a cánceres hematológicos. Algunos ejemplos no
 20 limitantes incluyen: leucemia granulocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia
 mielógena aguda, adenocarcinoma, cáncer suprarrenal, astrocitoma anaplásico,
 angiosarcoma, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, linfoma de
 células B, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de
 médula ósea, cáncer intestinal, cáncer cerebral, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral,
 25 cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello de útero, colangiocarcinoma,
 condrosarcoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon ,
 cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo, melanoma cutáneo, astrocitoma
 difuso, carcinoma ductal in situ, cáncer endometrial, endimoma, sarcoma epiteliode, cáncer
 de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de los conductos biliares extrahepáticos, cáncer de
 30 ojo, cáncer de las trompas de Falopio, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico,
 cáncer gastrointestinal, cáncer carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma
 gastrointestinal, tumor de células germinales, glioblastoma multiforme, glioma, leucemia de
 células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, hemangioendotelioma, linfoma de Hodgkin, cáncer
 de hipofaringe, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, cáncer de mama
 35 inflamatorio, cáncer intestinal, cáncer de los conductos biliares intrahepáticos, cáncer de
 mama invasivo / infiltrante, cáncer de células de islotes, cáncer de mandíbula, sarcoma de

Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leiomiomasarcoma, metástasis leptomeníngicas,
 leucemia, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma lobular in situ,
 astrocitoma de bajo grado, cáncer de pulmón, cáncer de ganglio linfático, linfoma, cáncer de
 5 mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, carcinoma
 de células de Merkel, condrosarcoma mesenquimal, mesenquimatoso, mesotelioma, cáncer
 de mama metastásico, melanoma metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico,
 gliomas mixtos, cáncer de boca, carcinoma mucinoso, melanoma de la mucosa, mieloma
 múltiple, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal, cáncer de
 10 nasofaringe, cáncer de cuello, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, linfoma no Hodgkin,
 cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células de avena, cáncer ocular, melanoma
 ocular, oligodendroglioma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, sarcoma
 osteogénico, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor de células
 germinales ováricas, carcinoma peritoneal primario ovárico, tumor estromal de cordón sexual
 ovárico, cáncer pancreático, carcinoma papilar, cáncer de seno paranasal, cáncer de
 15 paratiroides, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de nervio periférico, cáncer de peritoneo,
 cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor de la región pineal, cáncer
 de la glándula pituitaria, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata,
 cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal, rabdomiosarcoma, cáncer
 de la glándula salival, sarcoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino,
 20 cáncer de seno, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado,
 cáncer de columna, cáncer de columna vertebral, cáncer de la médula espinal, tumor espinal,
 cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T,
 cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma / carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer
 de lengua, cáncer de amígdalas, cáncer de células transicionales, cáncer de mama triple
 25 negativo, cáncer tubario, carcinoma tubular, cáncer uretral, adenocarcinoma uterino, cáncer
 uterino, cáncer vaginal y cáncer de vulva.

El término "fase mineral sustancialmente pura" se refiere a una fase mineral que consiste
 mayoritariamente en único tipo de mineral ($\geq 95\%$). En este caso, una fase mineral
 30 sustancialmente pura de magnetita significa que los cristales de magnetita no contienen
 siderita. La fase mineral sustancialmente pura de magnetita puede contener pequeñas
 cantidades de goetita ($\leq 5\%$) si el pH se eleva por encima de 9 durante el proceso de
 producción.

El término "superparamagnetismo" se refiere a una forma de magnetismo que aparece en
 35 pequeñas nanopartículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas. Por debajo de un determinado

tamaño las nanopartículas magnéticas no pueden mantener las paredes estáticas de los distintos dominios magnéticos comportándose como un spin gigante de momento magnético. Una partícula superparamagnética puede estar libre (equilibrada térmicamente) o bloqueada (no equilibrada). La temperatura de bloqueo (T_B) se determinó como aquella a la que ocurre el máximo de magnetización en las curvas ZFC, mientras que la temperatura de irreversibilidad (T_{irr}) es aquella justo por debajo del bloqueo de las nanopartículas superparamagnéticas que ya no están térmicamente equilibradas.

El término “sustancia señalizadora” se refiere a cualquier molécula que puede unirse de manera específica a otra sustancia dada. Ejemplos no limitantes incluyen anticuerpos, aficuerpos, aptámeros, etc. En situación preferencial la sustancia señalizadora es un anticuerpo monoclonal.

El término “nanopartículas inorgánicas de magnetita” o MNPs se refiere a cualquier nanopartícula de magnetita que se obtiene o puede ser obtenida mediante métodos de síntesis química en ausencia de cualquier agente biológico y/o producto.

El término “MamC” se refiere a una proteína completa que se deriva del gen *mamC* (NCBI Database, número de acceso ABK44766.1, proteína Mmc1_2265). El término “MamC” también incluye fragmentos funcionales y variantes de la proteína derivados del gen *mamC* que pudieran ser expresados en sistemas biológicos o sintetizados. Fragmentos funcionales de MamC se describen previamente en (Nudelman et al., 2016; Nudelman et al., 2018; patente WO 2017153996). En particular, los fragmentos funcionales que contienen la región del bucle entre las regiones transmembrana (MamC-MIL) (Nudelman et al., 2016). Los fragmentos funcionales pueden estar ligados a otra proteína como MBP.

El término “Mms6” se refiere a una proteína completa que se deriva del gen *mms6* (NCBI Database, número de acceso ABK44766.1, proteína Mmc1_2275). El término “Mms6” también incluye fragmentos funcionales y variantes de la proteína derivados del gen *mms6* que pudieran ser expresados en sistemas biológicos o sintetizados.

El término “Mms7” se refiere a una proteína completa que se deriva del gen *mms7* (UniProtKB número de referencia Q2W8R9). El término “Mms7” también incluye fragmentos funcionales y variantes de la proteína derivados del gen *mms7* que pudieran ser expresados en sistemas biológicos o sintetizados.

El término "variante funcional" se refiere a cualquier variante o mutante que tiene un determinado porcentaje (grado) de homología con la proteína y que mantiene la función de la proteína. En situación de preferencia, una variante funcional presenta un grado de homología con la proteína superior al 75 %. Preferiblemente grados de homología del 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % con la proteína original. Más preferentemente un grado de homología del 95 % con la proteína original.

El grado de identidad entre secuencias de proteínas se puede determinar por métodos convencionales. Por ejemplo, usando algoritmos estándar para el alineamiento de secuencias, conocidos en el área como BLAST (Altschul et al. 1990 J Mol Biol. 215 (3): 403-10) o CLUSTAL O (1.2.1). En situación preferencial el grado de homología se determina usando BLAST o CLUSTAL O.

Método

En primer lugar, la presente invención proporciona un método para producir una composición de una fase mineral sustancialmente pura de magnetita superparamagnética que comprende los siguientes pasos: (a) preparar una solución de carbonato, (b) añadir FeCl_3 a la solución de carbonato, (c) agregar MamC y, opcionalmente, Mms6 a la solución obtenida en el paso (b), (d) incubar la solución obtenida en el paso (c) durante al menos 30 minutos, (e) añadir $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ a la solución obtenida en el paso (d), y (f) ajustar el pH de la solución obtenida en el paso (e) a pH 9 usando una base; el método se realiza a 25 °C y 1 atmósfera de presión. Todas las soluciones utilizadas son previamente desoxigenadas. Para un mejor resultado, el método de la presente invención se realiza en condiciones anóxicas, es decir, menos de 40 ppb de oxígeno en la solución.

La presente invención proporciona una secuencia de etapas, que son esenciales para producir una composición que esté libre de cualquier nivel detectable de siderita. La secuencia de pasos proporcionados permite que la proteína MamC, que es altamente hidrófoba, permanezca plegada y funcional mientras se mantiene la solución sobresaturada para la magnetita de tal manera que la precipitación de la magnetita se favorece cinéticamente con respecto a la de la siderita. Por lo tanto, obtener la secuencia correcta requiere un cuidadoso equilibrio de estos tres aspectos.

En las mejores condiciones, también se agrega Mms7 a la solución obtenida en el paso (b) en el paso (c) del método.

En las mejores condiciones, la concentración de la proteína(s) añadida(s) en el paso (c) debe ser al menos 2 mg/ml. En las mejores condiciones, la concentración de la solución de MamC que se añade a la solución en el paso (c) es de 2-5 mg/mL. Concentraciones mayores pueden inducir agregación y, por tanto, prevenir o reducir la eficacia de la mediación de MamC en la biomineralización de magnetita. Menores concentraciones resultarán en cristales de magnetita de tamaño muy pequeño (< 5 nm) debido a la prevalencia del efecto del tampón TRIS en el proceso de biomineralización. Esta realización no se refiere a la concentración final de la solución de proteína(s). Esta condición se refiere a la concentración de la solución madre que se añade a la solución obtenida después del paso (b).

En las mejores condiciones, la solución se incuba durante al menos 1 hora en el paso (d).

En las mejores condiciones, la solución de carbonato comprende NaHCO_3 y/o Na_2CO_3 y, opcionalmente, la base es NaOH.

En las mejores condiciones, la concentración final de la solución obtenida en el paso (f) es 3,5 mM de NaHCO_3 , 3,5 mM de Na_2CO_3 , 2,78 mM de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, 5,56 mM de FeCl_3 y una cantidad variable de MamC y, opcionalmente, Mms6. Preferiblemente, la concentración final de MamC es de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, si se incluye Mms6, la concentración final de MamC es de al menos 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la concentración final de Mms6 es de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Composición

En segundo lugar, la presente invención proporciona una composición obtenida u obtenible a través de los métodos de la presente invención. En tercer lugar, la presente invención proporciona una composición que comprende: (i) una fase mineral sustancialmente pura de magnetita superparamagnética, (ii) la proteína MamC y (iii) opcionalmente, la proteína Mms6; en donde, al menos los componentes (i) y (ii) forman nanopartículas magnéticas superparamagnéticas que contienen hasta 5% en peso de MamC (BMNPs mediadas por MamC se componen entonces de ~95% en peso de magnetita y ~5% en peso de MamC), con un tamaño medio de partícula entre 30-120 nm, punto isoeléctrico de ~4,4, área superficial de ~ 90 m^2/g , temperatura de bloqueo de ~145 $^\circ\text{K}$ y temperatura de irreversibilidad de ~292 $^\circ\text{K}$.

35

En las mejores condiciones, todos los siguientes aspectos de la presente invención son aplicables al segundo y al tercer aspecto de la presente invención. Es evidente que el segundo y el tercer aspecto de la presente invención pueden referirse a la misma composición.

- 5 En las mejores condiciones, no hay niveles detectables de siderita en la composición y los niveles de goetita son $\leq 5\%$ del sólido total.

En las mejores condiciones, el tamaño medio de partícula de las nanopartículas magnéticas es de 30-50 nm. Preferiblemente, el tamaño medio de partícula de las nanopartículas magnéticas es de 30-40 nm. En las mejores condiciones, el tamaño medio de partícula se determina mediante Microscopía electrónica de transmisión. En los ejemplos de la presente invención, los tamaños se obtuvieron midiendo el tamaño de más de 1000 cristales en cada imagen de Microscopía electrónica de transmisión.

- 15 En las mejores condiciones, el % en peso de MamC en las BMNPs es 2-20% en peso. Preferiblemente, el % en peso de MamC en las BMNPs es 2-10% en peso. En las mejores condiciones, el % en peso de MamC en las BMNPs se determina mediante análisis termogravimétrico. En los ejemplos de la presente invención, el % en peso de MamC en las BMNPs es 5% en peso.

20 La composición puede comprender además otras proteínas implicadas en la formación de magnetita en los magnetosomas de bacterias y/u otras proteínas con dominios ácidos capaces de unir hierro y/o aquellos con una estructura tal que pudieran funcionar como una plantilla para nucleación y crecimiento de magnetita. Los ejemplos no limitantes de tales proteínas incluyen Mms6, Mms7, MmsF / MamF y sus proteínas homólogas en diferentes bacterias magnetotácticas. En las mejores condiciones, la composición comprende además Mms7.

30 En las mejores condiciones, el punto isoeléctrico de las BMNPs es 3-7. Preferentemente, el punto isoeléctrico de las BMNPs es 3-5. En las mejores condiciones, el punto isoeléctrico de las BMNPs se calcula a partir de medidas de movilidad electroforética. En los ejemplos de la presente invención, el punto isoeléctrico de las BMNPs es 4,4.

35 En las mejores condiciones, el área superficial específica de las BMNPs es 30-120 m²/g. Preferentemente, el área superficial específica de las BMNPs es 50-100 m²/g. En las mejores

condiciones, el área superficial específica de las BMNPs se determina a partir de BET. En los ejemplos de la presente invención, el área superficial específica de las BMNPs es 97 m²/g.

5 Las nanopartículas formadas usando la proteína MamC exhiben una alta magnetización por partícula a temperatura ambiente que es igual o mayor que aquella de las nanopartículas obtenidas mediante métodos inorgánicos o mediante el uso único de la proteína Mms6. Por lo tanto, en las mejores condiciones, la magnetización de las BMNPs es de 40-70 emu/g a 300 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. Preferentemente, la magnetización de las BMNPs es de 55-65 emu/g a 300 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. En condiciones óptimas, la magnetización de las BMNPs es de 10 55 emu/g (61 emu/g cuando se tiene en cuenta la cantidad de MamC en el cristal) a 300 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe.

En las mejores condiciones, la temperatura de bloqueo de las BMNPs es de al menos 100 K 15 cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. Preferiblemente, la temperatura de bloqueo es de al menos 120 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. En condiciones óptimas, la temperatura de bloqueo es de al menos 130 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe.

20 En las mejores condiciones, la temperatura de irreversibilidad de las BMNPs es de al menos 200 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. Preferiblemente, la temperatura de irreversibilidad es de al menos 250 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe. En condiciones óptimas, la temperatura de irreversibilidad es de al menos 280 K cuando se aplica un campo magnético externo de 500 Oe.

25 Una ventaja de las nanopartículas biomiméticas en comparación con las inorgánicas es el hecho de que las proteínas cambian las propiedades de la superficie debido a que MamC se adsorbe y/o incorpora a la superficie del cristal hasta en un 5 % en peso (Figura 6B). En particular, por ejemplo, las MamC-magnetitas no están cargadas a un pH de 30 aproximadamente 4 (Figura 6A). Por lo tanto, están fuertemente cargadas a un pH fisiológico (pH = 7,4) y pueden adsorber altas cantidades de fármacos polares. Dicha adsorción es estable a pH fisiológico y se produce una liberación insignificante de fármaco a este pH. Sin embargo, cuando la nanopartícula funcionalizada está expuesta a valores de pH ácido (como los que existen en el microambiente tumoral o dentro del lisosoma celular), la partícula se 35 descarga y libera el fármaco. Por el contrario, las nanopartículas de magnetita inorgánica (MNPs) no presentan carga a un pH de aproximadamente 7,4 y, por lo tanto, son neutras o

ligeramente cargadas a pH fisiológico. Por lo tanto, se espera baja adsorción y alta liberación de fármaco a valores de pH fisiológicos. Para evitar esto, la nanopartícula debe estar cubierta por un recubrimiento molecular que permita una funcionalización estable. Este paso no es necesario en las nanopartículas biomiméticas que son el objeto de esta patente.

5

En las mejores condiciones, las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser cualquier agente que tenga un efecto terapéutico cuando se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferiblemente, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o una molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico incluyen tanto ARN como ADN. El ARN puede ser un siARN, miARN o gARN (gARN para su uso en los enfoques de edición de genes CRISPR / Cas9).

En las mejores condiciones, las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con un agente quimioterapéutico. En las mejores condiciones, el agente quimioterapéutico es polar. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico es doxorubicina.

En las mejores condiciones, las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con una sustancia señalizadora. Preferiblemente, la sustancia señalizadora es un ligando para un receptor del factor de crecimiento (tal como un factor de crecimiento), un anticuerpo o un aptámero. Más preferiblemente, la sustancia señalizadora es un anticuerpo monoclonal.

En las mejores condiciones, las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con un agente quimioterapéutico y una sustancia señalizadora. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico es doxorubicina y la sustancia señalizadora es un anticuerpo monoclonal.

25

En las mejores condiciones, la composición consiste en: (i) una fase mineral sustancialmente pura de magnetita superparamagnética, (ii) MamC y (iii) opcionalmente, Mms6 y/o Mms7; en donde, al menos los componentes (i) y (ii) forman nanopartículas magnéticas superparamagnéticas que contienen hasta 5% en peso de MamC (BMNPs mediadas por MamC se componen entonces de ~95% en peso de magnetita y ~5% en peso de MamC), con un tamaño medio de partícula entre 30-120 nm, punto isoeléctrico de ~4,4, área superficial de ~ 90 m²/g, temperatura de bloqueo de ~145 K y temperatura de irreversibilidad de ~292 K.

En las mejores condiciones, la composición no deriva, no se obtiene ni se puede obtener a partir de un magnetosoma. Más preferiblemente, la composición no se obtiene de un magnetosoma. Para aclarar, en esta condición, aunque las proteínas usadas en la

35

composición pueden derivarse de un magnetosoma, las BMNPs se obtienen usando el enfoque de precipitación *in vitro* descrito en la presente invención. En otras palabras, las nanopartículas magnéticas superparamagnéticas son nanopartículas magnéticas biomiméticas superparamagnéticas (BMNPs).

5

En las mejores condiciones, las nanopartículas magnéticas superparamagnéticas son nanopartículas magnéticas biomiméticas superparamagnéticas.

El término "magnetosoma" se refiere tanto a magnetosomas naturales presentes en bacterias magnetotácticas como a magnetosomas recombinantes o estructuras similares a magnetosomas que son producidas por un huésped que normalmente no contiene magnetosomas o estructuras similares a magnetosomas.

10

Formulación de magnetoliposomas

15

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una formulación de magnetoliposomas la cual comprende: (i) la composición de la presente invención, (ii) un agente formador de liposomas; y (iii) opcionalmente, nanopartículas inorgánicas de magnetita superparamagnéticas (MNPs).

20

El agente formador implicado en la formulación de magnetoliposomas es, preferiblemente, un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. El fosfolípido usado puede ser o comprender, por ejemplo: fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidil-inositol. El fosfolípido más típico es la fosfatidilcolina, la cual puede ser sintetizada o aislada de una gran variedad de fuentes naturales. Además de la fosfatidilcolina, existen otros fosfolípidos que también pueden ser utilizados en la formulación, ya sea como agentes formadores o como componentes adicionales. Estos fosfolípidos son: diacetil fosfato (DCP), dimiritoilfosfatidilcolina (DMCP), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dioleoil fosfatidilcolina (DOPc), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidilserina (PS), por lo que el lípido implicado en la formulación puede estar hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. Los magnetoliposomas se pueden formar usando los lípidos auxiliares convencionales mediante técnicas conocidas por la persona experta en el arte, tales como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

25

30

Aunque los liposomas se han utilizado para el recubrimiento de nanopartículas de magnetita inorgánicas, no se ha realizado previamente la encapsulación de nanopartículas biomiméticas

35

en liposomas. Debido a que las propiedades superficiales de ambas partículas son muy diferentes, el proceso de estabilización de sendos tipos de partículas previo al encapsulamiento en el liposoma es muy diferente. Encapsular las nanopartículas sin una estabilización previa podría resultar en la aglomeración de dichas partículas. Las nanopartículas aglomeradas no serían útiles para su uso en aplicaciones nanotecnológicas. Por lo tanto, el proceso para la obtención de magnetoliposomas que comprende el uso de nanopartículas de magnetita biomiméticas no es obvio o sencillo.

Nanopartículas superparamagnéticas como las nanopartículas de magnetita inorgánicas (MNPs) pueden ser especialmente útiles para su uso como agentes de contraste en la obtención de imágenes de resonancia magnética, así como para su uso en tratamientos de hipertermia consecuentes del incremento de temperatura provocado por la rotación de las nanopartículas magnéticas, la cual es inducida por un campo magnético alterno o por radiación. Por lo tanto, un magnetoliposoma que presente MNPs de mayor y menor tamaño puede aprovechar las ventajas de ambos tipos de nanopartículas. En este aspecto, en una realización preferida de la invención, la formulación del magnetoliposoma presenta además MNPs.

En una realización preferida de la invención, los magnetoliposomas de la formulación del magnetoliposoma se funcionalizan con agentes terapéuticos y/o con una sustancia de direccionamiento. Los magnetoliposomas se pueden funcionalizar a través de cualquier método común conocido en la técnica. Por ejemplo, los magnetoliposomas se pueden funcionalizar mediante los métodos descritos por Torchilin et al., 2001. El agente terapéutico puede ser cualquier agente que presente un efecto terapéutico cuando se administre en una cantidad efectiva terapéuticamente. En una realización preferida de la invención, el agente terapéutico es un agente quimioterápico y la sustancia de direccionamiento es un anticuerpo. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Composición farmacéutica

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica la cual comprende la composición de la presente invención o la formulación de magnetoliposoma de la presente invención y un vehículo y/o disolvente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica puede comprender una o más soluciones, las cuales son adecuadas para la administración intravenosa, intra-

arterial, intramuscular y/o subcutánea. En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender una o más soluciones, las cuales son adecuadas para rutas de administración sublingual, bucal y/o mediante inhalación. En una realización alternativa, la composición farmacéutica puede comprender uno o más aerosoles, los cuales son adecuados para la administración mediante inhalación.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica puede comprender una o más cremas y/o ungüentos, los cuales son adecuados para la administración tópica. En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica puede comprender uno o más supositorios los cuales son adecuados para la administración rectal o vaginal. En esta realización, la composición se puede usar con el objetivo de lograr un efecto local.

Tratamiento de enfermedades como el cáncer

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona la composición de la presente invención, la formulación de magnetoliposomas de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para su uso como medicamento. En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona la composición de la presente invención, la formulación de magnetoliposomas de la presente invención o la composición farmacéutica de la presente invención para su uso en el tratamiento de cáncer.

En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia granulocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, adenocarcinoma, cáncer suprarrenal, astrocitoma anaplásico, angiosarcoma, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, linfoma de células B, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, cáncer intestinal, cáncer cerebral, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello de útero, colangiocarcinoma, condrosarcoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo, melanoma cutáneo, astrocitoma difuso, carcinoma ductal in situ, cáncer endometrial, ependimoma, sarcoma epiteliode, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer de los conductos biliares extrahepáticos, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, glioblastoma multiforme, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, hemangioendotelioma, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, carcinoma ductal

infiltrante, carcinoma lobulillar infiltrante, cáncer de mama inflamatorio, cáncer intestinal, cáncer de los conductos biliares intrahepáticos, cáncer de mama invasivo/ infiltrante, cáncer de células de islotes, cáncer de mandíbula, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leiomiomasarcoma, metástasis leptomeníngicas, leucemia, cáncer de labio, liposarcoma, 5
cáncer de hígado, carcinoma lobular in situ, astrocitoma de bajo grado, cáncer de pulmón, cáncer de ganglio linfático, linfoma, cáncer de mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, carcinoma de células de Merkel, condrosarcoma mesenquimal, mesenquimatoso, mesotelioma, cáncer de mama metastásico, melanoma metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, gliomas mixtos, cáncer de boca, 10
carcinoma mucinoso, melanoma de la mucosa, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal, cáncer de nasofaringe, cáncer de cuello, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de células de avena, cáncer ocular, melanoma ocular, oligodendroglioma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, sarcoma osteogénico, 15
osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales ováricas, carcinoma peritoneal primario ovárico, tumor estromal de cordón sexual ovárico, cáncer pancreático, carcinoma papilar, cáncer de seno paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de nervio periférico, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor de la región pineal, cáncer de la 20
glándula pituitaria, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal, rhabdomiosarcoma, cáncer de la glándula salival, sarcoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, cáncer de seno, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de intestino delgado, cáncer de columna, cáncer de columna vertebral, cáncer de la médula espinal, tumor espinal, 25
cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma/carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de lengua, cáncer de amígdalas, cáncer de células transicionales, cáncer de mama triple negativo, cáncer tubario, carcinoma tubular, cáncer uretral, adenocarcinoma uterino, cáncer uterino, cáncer vaginal, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, tiomas, 30
cáncer de vejiga de células transicionales, tumor de Wilms, macroglobulinemia de Waldenström y cáncer de vulva. Preferiblemente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, sarcoma óseo, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, 35
neuroblastoma, cáncer ovárico, cáncer de pulmón de microcítico, sarcoma de tejidos blandos,

timomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga de células transicionales, sarcoma uterino, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenström.

5 En una realización preferida, la presente invención proporciona una composición que comprende: (i) una fase mineral sustancialmente pura de magnetita biomimética superparamagnética, (ii) MamC, y (iii) opcionalmente, Mms6; donde, al menos los componentes (i) y (ii) forman nanopartículas magnéticas superparamagnéticas que contienen hasta 5 % en peso de MamC (MamC-mediadas BMNPs se componen entonces de ~95 % en peso de magnetita y ~5 % en peso de MamC), con un tamaño medio de partícula entre 30-
10 120 nm, punto isoeléctrico de ~4,4, área superficial de ~ 90 m²/g, temperatura de bloqueo de ~145 K y temperatura de irreversibilidad de ~292 K y donde las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con un agente quimioterapéutico; y un transportador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico es doxorrubicina y el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda, leucemia
15 mieloblástica aguda, sarcoma óseo, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer ovárico, cáncer de pulmón microcítico, sarcoma de tejidos blandos, timomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga de células transicionales, sarcoma uterino, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenström.

20 En una realización preferida, el tratamiento del cáncer implica el uso de un tratamiento de hipertermia. En tal tratamiento, se usa un campo magnético alterno o radiación para hacer rotar a las nanopartículas magnéticas. Entonces las nanopartículas magnéticas aumentan la temperatura ambiente en respuesta a la energía generada a través de las rotaciones. Si las
25 nanopartículas de magnetita se localizan en las células cancerosas, pueden provocar la muerte de las células cancerosas debido al aumento de calor.

Usos

30 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona el uso de la composición de la presente invención, de la formulación de magnetoliposoma de la presente invención o de la composición farmacéutica de la presente invención para la preparación de un agente de contraste para su uso en técnicas clínicas de imagen tales como la imagen por resonancia magnética. En un noveno aspecto, la presente invención proporciona el uso de la composición
35 de la presente invención para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos.

También se prevén otros usos de la composición de la presente invención, de la formulación de magnetoliposoma de la presente invención o de la composición farmacéutica de la presente invención, los cuales también forman parte de la invención. Estos usos incluyen el uso de la composición de la presente invención, de la formulación de magnetoliposoma de la presente invención o de la composición farmacéutica de la presente invención como un
5 separador molecular (por ejemplo, mediante la funcionalización de las nanopartículas con anticuerpos para capturar una molécula específica y luego separar dicha molécula mediante el uso de una fuerza magnética) y el uso de la composición de la presente invención, de la formulación de magnetoliposoma de la presente invención o la composición farmacéutica de
10 la presente invención como biosensor. El biosensor se puede utilizar para su uso en un entorno clínico o ambiental.

Ejemplos

Ejemplo 1: Alineamiento múltiple de las secuencias de MamC y Mms6

Un alineamiento múltiple de las secuencias de MamC y Mms6 de MC-1 con otras proteínas homólogas de otras bacterias magnetotácticas mostró algunas similitudes en su dominio C-terminal y también en el bucle dentro de los dos dominios transmembrana. Este bucle es rico en aminoácidos ácidos (aspartato y glutamato) y en aminoácidos que contienen grupos
20 hidroxilo (tirosina, treonina y serina) que pueden unir cationes metálicos. (Figuras 1 y 2).

Ejemplo 2: Clonación y expresión de MamC y Mms6

La clonación, expresión y purificación de MamC se llevó a cabo como se describe en Valverde-Tercedor et al. 2015. En resumen, el gen *mamC* (NCBI Database, número de acceso
25 ABK44766.1, proteína Mmc1_2265) se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa y se clonó en un vector pTrcHis-TOPO (Life Technologies: Invitrogen, Grand Island, NY) para que la proteína recombinante MamC se expresara con una cola de hexahistidina N-terminal. El vector recombinante se transformó en una cepa TOP10 de *Escherichia coli* (Life Technologies: Invitrogen) y se verificó por secuenciación de
30 didesoxinucleótidos usando un secuenciador ABI modelo 3100 (Life Technologies: Applied Biosystems).

Para la expresión y purificación de la proteína MamC, se incubaron células TOP10 de *E. coli* transformadas a 37°C y se indujo la expresión de la proteína con isopropil β-D-1-
35 tiogalactopiranosido (IPTG). Las células se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón A (tampón de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, guanidina 6

M, pH 8,0) y se rompieron mediante sonicación. La fracción soluble se separó por centrifugación y se cargó en una columna HiTrap HP (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón B (tampón de fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, urea 8 M, pH 8,0), utilizando un sistema ÄKTA Prime Plus FPLC (GE Healthcare). La columna se lavó luego con tampón B, seguido de tampón B ajustado a pH 6. Finalmente, la proteína se eluyó con tampón B ajustado a pH 4. El eluido se dializó durante la noche a 4 °C contra tampón C (tampón Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 6 M de urea, pH 8,5). Para reducir la concentración de urea, el tampón de diálisis se diluyó paso a paso 1: 2 (cuatro veces) con tampón C nuevo sin urea (denominado tampón D) y se dializó durante otras 2-4 h después de cada paso de dilución excepto en el último paso dializado durante la noche.

El gen *mms6* (NCBI Database, número de acceso ABK44776.1, proteína Mmc1_2275) se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores específicos: f6 (SEQ ID NO: 1, 5'-ATGCCTGTTGCTGTACCAAATAAAGC-3') y r6 (SEQ ID NO: 2, 5'-TCAGCTAATGGCCTCTTCCAATTC-3'). Como en el caso de *mamC*, el gen *mms6* amplificado se clonó en un vector pTrcHis-TOPO. El vector recombinante también se usó para transformar una cepa TOP10 de *Escherichia coli* y se verificó por secuenciación de didesoxinucleótidos.

La expresión y purificación de la proteína Mms6 se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que el descrito anteriormente para la purificación de MamC, pero utilizando en su lugar IPTG 1 mM. Las células se recogieron por centrifugación (4508 g, 10 min, 4 °C), se resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) complementado con lizozima 0,5 mg/ml y lauroil sarcosinato de sodio al 5% (sarcosil) y se rompieron por sonicación. La fracción soluble se separó por centrifugación (15151 g, 40 min, 4 °C) y se cargó en una columna HiTrap HP (GE Healthcare) utilizando un sistema ÄKTA Prime Plus FPLC (GE Healthcare). La columna se equilibró previamente con tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) complementado con imidazol 20 mM y TRITON X-100 a 1,3 x la concentración micelar crítica (CMC) para reducir la agregación de proteínas y mejorar la estabilidad de la proteína. La elución de Mms6 (2 ml / min) se realizó aplicando un gradiente de imidazol continuo de 20 a 500 mM. Las fracciones se recogieron y analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%. Las fracciones que contenían proteína Mms6 se sometieron a una etapa cromatográfica adicional en una columna de hidrofobicidad C4 (Jupiter® 5 µm C4 300 Å, columna LC 150 x 4,6 mm) utilizando un sistema HPLC (Agilent 1100) para eliminar contaminantes menores, proteínas de *E. coli* y ácidos nucleicos. En este caso, la elución de la proteína Mms6 (0,5 ml/min) se produjo aplicando un gradiente de disolvente orgánico continuo (ácido trifluoroacético y acetonitrilo)

en agua debido a la alta hidrofobicidad de Mms6. La pureza de la proteína Mms6 se ensayó mediante SDS-PAGE al 12% teñida con Coomassie. La concentración de proteína se determinó usando un ensayo de proteína Bradford (Bradford, 1976) y usando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), usando el coeficiente de extinción molar correspondiente a 280 nm ($17085 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Como experimento control, las células competentes TOP10 también se transformaron con pTrcHis-TOPO que no contenía los genes de interés. El protocolo de purificación de MamC y Mms6 se siguió con esas bacterias transformadas y sus fracciones de elución correspondientes se usaron para experimentos de precipitación de magnetita (control).

La Figura 1 es un gel de SDS-PAGE de las proteínas MamC y Mms6 purificadas.

15 Ejemplo 3: Biomineralización de magnetita

Se prepararon soluciones desoxigenadas de NaHCO_3 / Na_2CO_3 (0,15 M / 0,15 M), FeCl_3 (1 M), $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ (0,5 M) y NaOH (5 M) utilizando agua Milli-Q desoxigenada libre de oxígeno (ultrapura) o "Tipo 1" tal como lo definen varias autoridades, p. ej. ISO 3696) según el siguiente procedimiento:

20

(1) Para preparar las soluciones anaeróbicas:

- a. Hervir el agua Milli-Q en un matraz Erlenmeyer en presencia de rocas burbujeantes hasta que se formen burbujas grandes y escapen de la solución.
- b. Una vez hervida, colocar el matraz en un baño de hielo e inmediatamente cubrirlo y dejar que burbujee con N_2 libre de O_2 durante una hora / L.
- c. Una vez burbujeadado, colocar el agua dentro de la Cámara Coy anaeróbica y preparar las soluciones en su interior.

25

(2) Preparar las soluciones de proteína anaeróbica a partir de una solución madre de proteína con una concentración de proteína superior a 2 mg / ml:

30

- a. Cubrir la solución de proteína con un septo de goma y burbujear con N_2 libre de O_2 .
- b. Una vez burbujeadado, colocar la solución dentro de la Cámara Coy anaeróbica.

35

(3) Para preparar la mezcla final para la precipitación de magnetita (preferiblemente 60 ml en botellas de vidrio de 100 ml):

- a. Agregar el volumen pertinente de las soluciones NaHCO_3 y Na_2CO_3 para asegurar una concentración final en la mezcla de reacción de 3,5 mM cada una,
- b. Agregar el volumen total pertinente del agua Milli-Q.
- 5 c. Agregar el volumen pertinente de la solución de FeCl_3 para asegurar una concentración final en la mezcla de reacción de 5,56 mM.
- d. Agregar la (s) proteína (s) si es necesario.
- e. Dejarlo reaccionar por una hora.
- f. Agregar el volumen pertinente de la solución de $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ para garantizar
- 10 una concentración final en la mezcla de reacción de 2,78 mM.
- g. Mientras se agita, agregar gotas de la solución de NaOH para elevar el valor del pH a un pH de 9.
- h. Cerrar las botellas con un septo de goma y séllelas y dejarlos reaccionar dentro de la cámara anaerobia Coy durante 30 días.

15

La cámara COY se llenó con 4% de H_2 en N_2 para evitar la posible oxidación. La precipitación de magnetita se llevó a cabo en experimentos en condiciones no controladas y mantenidos a 25°C y 1 atm de presión total siguiendo el protocolo descrito por los autores en el interior de la cámara anaeróbica. La mezcla de reacción final de la cual precipitó la magnetita contenía

20 NaHCO_3 3,5 mM / Na_2CO_3 3,5 mM, Fe 2,78 mM $(\text{ClO}_4)_2$ y FeCl_3 5,56 mM, y tenía un pH = 9. Se añadieron MamC y/o Mms6 a esta mezcla de reacción a concentraciones que variaban de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Específicamente, diecinueve experimentos de coprecipitación de magnetita se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones (tres repeticiones por condición): (1) dieciséis experimentos realizados mediante la adición de MamC y Mms6 a la solución de reacción a

25 concentraciones de proteína de 0, 2,5, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ y MamC / Las relaciones Mms6 y Mms6 / MamC que varían de 0 a 4, aquí se denominan experimentos que llevan MamC, Mms6, MamC-Mms6; (2) un experimento realizado añadiendo a la mezcla de reacción las proteínas "contaminantes" purificadas de las células transformadas con el pTrcHis-TOPO "vacío", aquí denominado experimento de vector vacío; (3) dos experimentos llevados a cabo añadiendo a

30 la mezcla de reacción el tampón en el que se almacena cada una de las proteínas (Tris 50 mM y NaCl 150 mM (aquí denominado experimento MamC-buffer) y 1,3 CMC TRITON X100 en agua (aquí denominado experimento de tampón Mms6), (4) un experimento inorgánico en el que no se añadieron proteínas y/o tampón a la mezcla de reacción.

35 Cada experimento se dejó avanzar dentro de la cámara anaeróbica durante 30 días, después de lo cual se recogió el producto precipitado. Los sólidos se concentraron en tubos con un

imán y el sobrenadante (que parecía completamente transparente) se descartó. A continuación, los precipitados se lavaron con agua Milli-Q desoxigenada libre de oxígeno dos veces y se realizó un último lavado con etanol absoluto (5 ml en cada reacción). Entre los lavados, cada matraz de reacción se agitó vigorosamente durante varios segundos, el precipitado se concentró magnéticamente y se eliminó el líquido. Después del último lavado con etanol, el precipitado se concentró en 1-2 ml de etanol, se selló herméticamente y se almacenó a -20 °C hasta que se analizó.

Ejemplo 4: Identificación de los precipitados

- 10 Las muestras de polvo de los precipitados se analizaron con un difractómetro de rayos X Xpert Pro (PANalytical, The Netherlands) utilizando la radiación de Cu K α , con el rango de exploración ajustado de 20 a 60° en 2 θ (0,01°/paso; 3 s por paso). La identificación de los precipitados se realizó utilizando el software X Powder (Martín Ramos, 2004).
- 15 Los sólidos formados en todos los experimentos de biomineralización (con y sin las proteínas) se identificaron como magnetita usando difracción de rayos X en polvo (XRD). Los sólidos no contenían niveles detectables de siderita.

Ejemplo 5: Tamaño y morfología de las partículas

- 20 La morfología y el tamaño de las nanopartículas de magnetita recogidas en esos experimentos se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio Carl Zeiss SMT LIBRA 120 PLUS. Las nanopartículas magnéticas se incluyeron en la resina Embed 812. Se prepararon secciones ultrafinas (50-70 nm) usando un microtomo Reichert Ultracut S (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) después de lo cual las secciones se depositaron en rejillas de cobre. El tamaño de los cristales se midió utilizando el programa ImageJ 1.47, y las curvas de distribución de tamaño se determinaron a partir de esas medidas utilizando Origin pro 9. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, se midieron los tamaños de partícula en múltiples micrografías con un exceso de 1000 nanopartículas medidas en cada experimento. Además, la significación estadística de los resultados obtenidos se probó usando la prueba de Tukey con un valor fijo de $\alpha < 0,05$. El TEM de alta resolución (HRTEM) también se realizó utilizando un FEI TITAN G2 80-300. Los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) se recogieron usando una abertura de 10 μ m. Los espaciados cristalinos d se midieron utilizando imágenes HRTEM y la dirección cristalográfica se determinó comparando esos datos con los de magnetita en el sitio web del Proyecto RRUFF (<http://rruff.info/ams/amcsd.php>).
- 35

El análisis de TEM de las partículas de magnetita producidas en el experimento MamC-buffer, el experimento con el buffer Mms6, el experimento de vector vacío y las magnetitas mediadas por Mms6 muestran tamaños de cristal similares (16 ± 6 nm) a los de las magnetitas recogidas del experimento de control inorgánico. Por otra parte, tampoco se observaron diferencias en la morfología, ya que todas las partículas estaban pobremente facetadas. Por lo tanto, el efecto potencial sobre el tamaño y/o la morfología del cristal observado en las magnetitas recogidas de los experimentos restantes debería atribuirse únicamente a las proteínas implicadas.

Las imágenes de TEM de las magnetitas mediadas por Mms6 muestran diferencias en tamaño y forma con respecto a los experimentos de control inorgánico en función de la concentración de Mms6 en solución. A una concentración Mms6 de $2,5 \mu\text{g/mL}$, se formaron cristales no facetados de 17 ± 7 nm. Sin embargo, a concentraciones de Mms6 de 5 y $10 \mu\text{g/mL}$, los cristales de magnetita tenían morfologías poliédricas más uniformes con caras bien facetadas y eran ligeramente más grandes (23 ± 9 y 22 ± 8 nm, respectivamente) en comparación con las magnetitas obtenidas de el control inorgánico (MNPs, Figura 3). El tamaño y la forma de las partículas de magnetita mediadas por MamC (BMNPs) también dependían de la concentración de proteína. Los cristales BMNPs formados en presencia de $2,5 \mu\text{g/ml}$ y $5 \mu\text{g/ml}$ de MamC se redondearon y tenían tamaños de 20 ± 6 nm y 22 ± 7 nm, respectivamente. A $10 \mu\text{g/ml}$ de MamC, los cristales de magnetita mostraban caras de cristal bien desarrolladas con morfologías rómbicas, rectangulares y cuadradas bidimensionales y tamaños de 37 ± 12 nm (Figura 3).

Cuando tanto MamC como Mms6 estaban presentes en la solución de reacción, se observaron efectos acumulativos de ambas proteínas, ya que los cristales de magnetita recogidos de estos experimentos mostraron mejores morfologías facetadas y/o tamaños mayores en comparación, no solo con cristales del experimento de control inorgánico, sino también a cristales recogidos de experimentos en los que solo una de las proteínas estaba presente. El efecto de la mezcla de proteínas sobre los cristales de magnetita dependía de la concentración de las dos proteínas y la proporción de proteínas. A bajas concentraciones de Mms6 ($2,5 \mu\text{g/mL}$), el tamaño de los cristales aumentó con la concentración de MamC hasta $[\text{MamC}] = 5 \mu\text{g/mL}$. Esta tendencia es idéntica a la observada en la concentración más alta de Mms6 ($10 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, a $[\text{Mms6}] = 5 \mu\text{g/mL}$ no se observó cambio en el tamaño de los cristales independientemente de la concentración de MamC en la solución. El mismo resultado se observa cuando el tamaño de los cristales se representa contra la relación MamC/Mms6, donde el tamaño promedio más grande de los cristales (31 ± 10 nm) se obtiene

a una relación MamC/Mms6 igual a 0,64 y una concentración de MamC de 5 $\mu\text{g/mL}$ (0,28 μM) y una concentración de Mms6 de 10 $\mu\text{g/mL}$ (0,44 μM) (Figura 3). Curiosamente, a mayores relaciones de MamC/Mms6, el tamaño del cristal disminuye y se encontró que esta disminución era estadísticamente significativa.

5

Las imágenes de HRTEM muestran que los cristales obtenidos a partir de los experimentos de control inorgánico tienen un cuadrado y algunas formas 2-D rombales delimitadas por las caras (111) (Figura 4). Además, algunos cristales mostraron esquinas redondeadas correspondientes a la cara (110) del cristal (Figura 4). Las nanopartículas mediadas por MamC expresaban la cara de cristal (111) con las esquinas redondeadas correspondientes a las caras de cristal nacientes (110) y (311) (Figura 4). En este caso, los cristales parecían alargados a lo largo de la dirección [111]. Los cristales obtenidos en presencia de la proteína Mms6 mostraron formas romboidales, rectangulares y hexagonales delimitadas por la cara (111) del cristal y esquinas redondeadas que corresponden a las caras (311), (110) y (400) del cristal (Figura 5). Estos cristales estaban alargados a lo largo de la dirección [111]. Las nanopartículas obtenidas a 5 $\mu\text{g/ml}$ de MamC y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Mms6 tenían formas y esquinas que eran más definidas que las observadas en las nanopartículas obtenidas cuando solo una de las proteínas estaba presente. En particular, los cristales de este experimento mostraron formas romboidales, rectangulares y hexagonales limitadas por las caras (111) del cristal y se alargaron a lo largo de la dirección [111]. Las esquinas bien definidas observadas corresponden a las caras (110), (311) y (400) del cristal (Figura 5).

10
15
20

Ejemplo 6: Medidas magnéticas

Las mediciones de magnetización se llevaron a cabo mediante el uso de un dispositivo de interferencia cuántica superconductor de diseño cuántico (SQUID) 5 T sistema de medición de propiedades magnéticas (MPMS). Bajo flujo suave de argón, se colocaron 1,6 mg de MNPs y 1,01 mg de BMNPs en una cápsula de policarbonato de doble pared. Se determinaron los ciclos de histéresis para cada tipo de nanopartículas a 5 K y 300 K.

Las medidas de enfriado a campo cero (Zero Field Cooling ZFC) y enfriado con campo externo (Field Cooling FC) se realizaron usando un magnetómetro superconducting quantum interference (SQUID) 5 T (Quantum Design MPMS XL, USA). Bajo flujo suave de argón, se colocó una cantidad diferente de cada polvo de muestra en una cápsula de policarbonato de doble pared. Las muestras se enfriaron inmediatamente en un campo aplicado de cero a 5 K para mantener la magnetización aleatorizada de los nanocristales, después de lo cual se aplicó un campo magnético de 500 Oe. Para permitir la comparación entre nanopartículas

30
35

sintetizadas de forma diferente, las curvas $M(T)$ se normalizaron por la cantidad de cada muestra analizada y por el valor de magnetización a 300 K.

5 Las nanopartículas sintetizadas en el experimento de control inorgánico exhiben la temperatura de bloqueo más baja ($T_B \sim 50$ K) que es característica de nanopartículas pequeñas y poco cristalinas (Figura 6). Las nanopartículas mediadas por Mms6 muestran curvas de magnetización similares (Figura 6) mientras que las nanopartículas mediadas por MamC exhiben una T_B más alta (~ 140 K), consistente con su mayor tamaño. Las nanopartículas obtenidas a 5 $\mu\text{g/ml}$ de MamC y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Mms6 muestran la mayor T_B ($T_B \sim 300$ K) con el aumento más lento de la magnetización, característica de partículas con alta
10 cristalinidad y un gran momento magnético por partícula.

Tanto las MNPs como las BMNPs presentan magnetización remanente a 5 K en ausencia de un campo externo, pero no a 300 K (Figura 6C), lo que confirma que ambas partículas son
15 superparamagnéticas y tienen una temperatura de bloqueo < 300 K. De acuerdo con los datos obtenidos, el valor de saturación de la magnetización (M_s) para las BMNPs es de 55 emu/g, mientras que para las MNPs es de 66 emu/g (Figura 6C). La diferencia en la saturación de la magnetización entre BMNPs y MNPs no es tan alta, teniendo en cuenta el efecto de dilución debido al recubrimiento, por lo que la reducción en el valor M_s para las BMNPs podría deberse
20 a la incorporación de MamC. De hecho, teniendo en cuenta que el porcentaje de MamC incorporado según los datos de TGA (9,4% en BMNPs y 4,5% en MNPs; Figura 6B), los valores corregidos de M_s para BMNPs y MNPs deberían ser respectivamente $55/(1-0,094) = 61$ emu/g y $66/(1-0,045) = 69$ emu/g, lo que indica que son idénticos dentro del rango de error experimental.

25 Además, las temperaturas de bloqueo (T_B) y las temperaturas de irreversibilidad (T_{irr}) de las partículas biomiméticas y las MNPs son también distintas. Las T_B más baja (103 K) y la T_{irr} (274 K) se corresponden con las MNPs (Figura 6D), seguidas de Mms6-BMNPs y MamC-BMNPs (Figura 6D). Mientras que las mayores T_B (260 K) y T_{irr} (296 K) corresponden al
30 complejo Mms6-MamC-BMNPs. La magnetización más lenta y los mayores valores de T_B corresponden a partículas con mayor momento magnético por partícula. Además, las menores diferencias entre T_B y T_{irr} indican menor polidispersidad.

Ejemplo 7: Medidas de área superficial específicas

35 Se analizaron las muestras en polvo para obtener las isothermas de adsorción de nitrógeno a 77 °K en un equipo TriStar 3000 (Micromeritics). Unos 50 mg de muestra se desgasificaron a

100 °C durante 4 h antes de los análisis usando un desgasificador (VacPrep 061, Micrometrics). El área superficial específica (SSA) de las muestras se determinó usando el método BET [27]. El SSA determinado mediante BET es $97 \pm 2 \text{ m}^2/\text{g}$.

5

Ejemplo 8: Medidas de movilidad electroforética y análisis termogravimétricos

La movilidad electroforética se midió en magnetitas inorgánicas (MNPs) y BMNPs. Suspensiones de cada tipo de nanopartículas se prepararon en 10 mL de NaClO_4 (10 mM) libre de oxígeno. Alícuotas de 200 μL de cada una de las suspensiones anteriores se
10 inocularon en once tubos que contenía NaClO_4 (10 mM) libre de oxígeno, siendo el volumen final de cada tubo 10 mL. Se ajustó el pH de cada tubo añadiendo HCl (0,1 M) libre de oxígeno o NaOH (0,1 M) libre de oxígeno hasta conseguir un pH en el rango 2 a 11, dependiendo de la muestra. Las muestras se sonicaron durante 2 minutos antes de las medidas. Se hicieron nueve replicas para cada medida.

15

Los análisis termogravimétricos (TGA) se hicieron en $\sim 10 \text{ mg}$ de sólido, calentando la muestra en una celdilla de aluminio en atmósfera de N_2 , a una velocidad de $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta una temperatura final de $950 \text{ }^\circ\text{C}$.

20 Las gráficas de potencial ζ en función del pH (Figura 6A) revelan diferencias significativas entre los valores medidos para las MNPs y las BMNPs. Ambas están positivamente cargadas a valores bajos de pH y negativamente cargadas a valores altos de pH, pero se diferencian en el punto isoeléctrico (iep). Mientras que este iep es 7,0 para las MNPs, este valor es de 4,4 para las BMNPs. Estos datos sugieren que MamC está fuertemente adherida (o quizá
25 incorporada) en el cristal. Esta observación se confirma con los análisis TGA (Figura 6B). El % peso total perdido por las BMNPs es 9,4, mientras que por las MNPs es 4,5, lo que indica que las BMNPs se componen de 95,1% en peso de magnetita y 4,9% en peso de MamC. Así, MamC parece tener un papel importante controlando, no solo la distribución de tamaños de las nanopartículas sino también sus propiedades superficiales.

30

Ejemplo 9: Magnetoliposomas

(1) Magnetoliposomas biomiméticos

Las nanopartículas de magnetita tienden a agregar debido a sus propiedades magnéticas y es necesaria la aplicación de un tratamiento adicional para evitar dicha agregación antes de
35 la producción de los magnetoliposomas. Con este objetivo, las nanopartículas biomiméticas se incubaron en 5 mL de glutamato 100 mM durante 12 horas. La concentración de las

nanopartículas era 4,5 mg/mL. A continuación, las partículas se lavaron 3 veces con agua para eliminar el glutamato. Después del lavado, las partículas se concentraron mediante el uso de un imán y el sobrenadante se descartó. Como se ha comentado, este procedimiento se repitió tres veces. Luego, las partículas fueron re-dispersadas en 1,67 mL de agua ([BMNP] 5 \approx 24 mg/mL). Esta suspensión se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μ m.

Los magnetoliposomas biomiméticos se sintetizaron mediante el método de hidratación del film. Para obtener la fina capa de película lipídica, la fosfatidilcolina (PC) se disolvió en 8 mL de cloroformo ([PC]= 1,25 mg/mL) formando una suspensión homogénea. El solvente se 10 evaporó usando un rotavapor (Büchi, Rotavapor-R) bajo una corriente de vacío a 400 rpm y 37 °C. Además, con el objetivo de eliminar cualquier resto de cloroformo, la muestra estuvo bajo una corriente de vacío durante 90 minutos. Luego, la fina capa de película lipídica se hidrató y dispersó con la suspensión de ferrofluido ([PC] \approx 6 mg/mL). Para asegurar una 15 dispersión completa, la mezcla estuvo en agitación durante 2 horas a 180-200 rpm. Después de esto, la suspensión de magnetoliposomas se conservó a 4°C durante 24 horas. Finalmente, los magnetoliposomas unilaminares se obtuvieron mediante el método de extrusión. Concretamente, la solución de magnetoliposomas se pasó 5 veces a través de una membrana de policarbonato (Whatman) de 200 y 100 nm, respectivamente, con ayuda de un extrusor (Avanti Polar Lipids) a 45 °C.

20

(2) Magnetoliposomas inorgánicos

Las nanopartículas inorgánicas, al igual que las nanopartículas biomiméticas, tienden a agregar. Sin embargo, el tratamiento aplicado para desagregarlas es diferente de aquel seguido para las nanopartículas biomiméticas, debido a las diferentes propiedades 25 superficiales que presentan ambas partículas. Debido a ello, las nanopartículas inorgánicas se incubaron en 5 mL de citrato 2M. El resto del protocolo utilizado para la obtención de magnetoliposomas inorgánicos fue idéntico a aquel seguido para la obtención de magnetoliposomas biomiméticos.

30 Ejemplo 10: Funcionalización de partículas con doxorubicina y DO-24

Las nanopartículas probadas fueron aquellas obtenidas usando 10 μ g/mL de la proteína MamC. Los precipitados resultantes se concentraron en tubos con un imán y el sobrenadante se descartó. A continuación, los precipitados se lavaron secuencialmente con agua Milli-Q libre de oxígeno tres veces, con una solución de SDS al 0,5 % y con agua libre de oxígeno de 35 nuevo. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en tampón HEPES con solución salina

(0,01 M HEPES, pH 7,2, 0,15 M NaCl) y se esterilizaron autoclavándolas a 121 °C durante 21 minutos.

Las nanopartículas de magnetita se funcionalizaron con DOXO y con el anticuerpo monoclonal DO-24 (mAb) purificado, el cual reconoce el ectodominio del receptor humano Met/HGF, que se considera un marcador tumoral, sobreexpresado en numerosos cánceres, como ya se describió con modificaciones menores (lafisco et al., 2010; lafisco et al., 2013; Oltolina et al., 2015). Brevemente, los acoplamientos se realizaron mezclando 2 mg de nanopartículas de magnetita con 1 mg/mL de DOXO disuelta en agua o con el mAb disuelto en el tampón HEPES con solución salina (nanopartículas de magnetita binarias) o con el mAb seguido de DOXO (nanopartículas de magnetita ternarias) en el interior de botes herméticamente cerrados para evitar la oxidación de la magnetita. Los experimentos de cinética de adsorción se llevaron a cabo a 25 °C con agitación (200 rpm) durante diferentes periodos de tiempo hasta 24 horas. Al final de cada periodo de incubación, las mezclas se lavaron 3 veces para separar las partículas de los sobrenadantes usando un imán. Las cantidades de DOXO y mAb adsorbidas se evaluaron mediante espectroscopia UV-Vis ($\lambda=490$ y 280 nm, respectivamente), calculando las diferencias entre las concentraciones de las moléculas en la solución antes y después de la adsorción en las nanopartículas de magnetita (el mencionado sobrenadante). Las nanopartículas funcionalizadas se resuspendieron en la solución salina tamponada con HEPES y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

En el caso de las nanopartículas de magnetita conjugadas con ambos motivos (DOXO y mAb) (las llamadas nanopartículas ternarias), se aplicaron secuencialmente los mismos protocolos, seguido cada uno por lavados extensivos. DO-24 mAb se acopló primero y la DOXO se acopló en el siguiente paso, en base a experimentos previos (lafisco et al., 2013).

Ejemplo 11: Citocompatibilidad y citotoxicidad de las nanopartículas binarias y ternarias

Cultivos celulares: la línea celular GTL-16, derivada de carcinoma gástrico humano pobremente diferenciado que expresa Met, y la línea celular Huh-7, derivada de carcinoma hepatocelular bien diferenciado que es negativo para Met, se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina. Las células se trasplantaron cuando alcanzaron 80-90% de confluencia.

Las células (aproximadamente 12×10^3 GTL-16/pocillo o 6×10^3 Huh-7/pocillo) se incubaron en placas de 96 pocillos durante 24 h; entonces se añadieron 100 μ L de las distintas

concentraciones de las diferentes nanopartículas de magnetita, funcionalizadas o sin funcionalizar, a cada micropocillo. Después de 3 días de incubación, la viabilidad celular se evaluó por el ensayo colorimétrico del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), como se describe en Oltolina et al., 2015. Brevemente, se añadieron 20 μL de solución de MTT (5 mg mL^{-1} en solución de PBS) a cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C durante 2 h y luego los sobrenadantes se aspiraron cuidadosamente. Después, se añadieron 125 μL de isopropanol 0,2 N HCl para disolver los cristales de formazán formados. Entonces se tomó cuidadosamente una alícuota de 100 μL de cada pocillo y se midió su densidad óptica en un lector de pocillos múltiples (2030 Multilabel Reader Victor TM X4, PerkinElmer) a 570 nm. La viabilidad de cultivos paralelos de células no tratadas se tomó como el 100% de viabilidad y los valores obtenidos en las células sometidas a los diferentes tratamientos se refirieron a este valor. Los experimentos se realizaron 3-5 veces usando 3 réplicas por cada muestra. En algunos experimentos, se usaron cantidades predefinidas o equimolares de DOXO soluble.

Para los experimentos con el instrumento XCELLIGENCE® las células, aproximadamente 12×10^3 GTL-16/pocillo o 6×10^3 HuH-7/pocillo, se sembraron en placas apropiadas de múltiples pocillos durante 24 h. A partir de este momento, se controló la impedancia (tiempo 0 del experimento) y se añadieron 100 μL de las diferentes nanopartículas de magnetita funcionalizadas a cada micropocillo. También se usaron cantidades equimolares de DOXO, ya sea soluble o adsorbida en las nanopartículas.

Cuando las nanopartículas de magnetita binarias y ternarias, ambas transportadoras de DOXO, se incubaron durante 3 días en las células, se comportaron de manera similar, es decir, ejercieron el mismo nivel de toxicidad, con respecto a las muestras de referencia no tratadas o a las muestras tratadas con DOXO soluble, excepto en el caso en el que se usaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de DOXO en las células GTL-16 (Figura 9). En este caso, las nanopartículas de magnetita ternarias funcionalizadas con el mAb fueron significativamente más tóxicas que las nanopartículas de magnetita binarias que sólo transportaban DOXO; no se observó tal diferencia en el caso de las Huh7, que no expresan el receptor diana del mAb. En todos los casos, ambos tipos de nanopartículas de magnetita mostraron toxicidad dependiente de la dosis y la toxicidad ejercida por la DOXO de la nanopartículas de magnetita fue menor que la ejercida por la DOXO soluble, de acuerdo con lo que ya reportó el equipo de investigación y otros para otros tipos de nanopartículas funcionalizadas. Por lo tanto, la especificidad de la toxicidad se restringió a una dosis estrecha de nanopartículas de magnetita ternarias. Dado que solo se obtienen datos a tiempo final en los experimentos de MTT, se realizaron experimentos que monitorizan en tiempo real la cinética de la respuesta citotóxica de las

nanopartículas de magnetita usando el aparato XCELLIGENCE. En este caso, en los experimentos realizados con células GTL-16 a dosis de 100 µg/ml de DOXO, las nanopartículas de magnetita ternarias funcionalizadas con el mAb fueron significativamente más tóxicas que las nanopartículas de magnetita binarias que sólo transportaban DOXO y tan eficaces como la DOXO soluble hasta las 48 h. Al tercer día, los tres tratamientos con DOXO, ya sea soluble o unida a ambos tipos de nanopartículas de magnetita, indujeron el mismo nivel de toxicidad, en línea con los datos del ensayo MTT. Cuando se realizaron los mismos experimentos en células Huh7, no se observaron diferencias significativas entre los efectos ejercidos por los dos tipos de nanopartículas de magnetita funcionalizadas, que se comportaron de manera similar y fueron solo ligeramente menos tóxicas que la DOXO soluble. En conjunto, estos datos indican que la funcionalización con el mAb proporciona especificidad a las nanopartículas de magnetita, dándoles la capacidad de dirigirse a las células que expresan el antígeno complementario.

15 Ejemplo 12: Biocompatibilidad y distribución de las nanopartículas *in vivo*

Se inyectaron ratones hembra BALB/c en la vena de la cola con nanopartículas de magnetita (10 µg de nanopartículas/g de peso de ratón) diluidas en un volumen final de 100 µl de PBS estéril. Los animales se monitorearon cada dos días hasta 1 mes. Los ratones se subdividieron en 5 grupos, diferenciados en el punto de tiempo de la eutanasia (de 1 hora a 2 meses). Para cada grupo compuesto por 3 ratones, también se usó un ratón no tratado de control. Sus órganos fueron recolectados, fijados, embebidos en parafina y procesados para su análisis histológico. Secciones seriadas se tiñeron con azul de Prusia y hematoxilina-eosina (Sigma Aldrich) y se sometieron a evaluación histológica por un patólogo independiente no informado de la identidad de las muestras. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva de la Comunidad Europea para el Cuidado y las Leyes Italianas sobre experimentación animal (Ley por el Decreto 116/92).

Se observó que todos los ratones inyectados con las nanopartículas de magnetita (10 µg/g de peso del ratón) estaban vivos y en buena forma durante al menos 60 días. Las secciones de cerebro, corazón, pulmón, bazo, hígado y riñón preparadas a partir de los animales 1, 4 h, 1, 7, 60 días después de la inyección no muestran ninguna alteración morfológica en comparación con las de los ratones control (Figura 11). Se detectaron pocas nanopartículas de magnetita, principalmente como agregados en los pulmones. Además, en el caso del bazo, que en los animales control no tratados ya era positivo para la tinción con azul de Prusia, dicha tinción fue indetectable 4 h y 1 día después de la inyección de las nanopartículas de magnetita, pero fue detectable al menos 1 semana después, si no antes. En conjunto, estos datos

confirman la toxicidad mínima/baja de las nanopartículas de magnetita hasta 10 µg/g de peso del ratón.

Referencias

- 5
- Alphandéry, E., Faure, S., Seksek, O., Guyot, F., Chebbi, I., 2011. Chains of magnetosomes extracted from AMB-1 magnetotactic bacteria for application in alternative magnetic field cancer therapy. *ACS Nano* 5, 6279–6296.
- Amemiya, Y., Arakaki, A., Staniland, S., Matsunaga, T., 2007. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. *Biomaterials* 28, 5381–5389.
- 10 Arakaki, A., Masuda, F., Amemiya, Y., Tanaka, T., Matsunaga, T., 2010. Control of the morphology and size of magnetite particles with peptides mimicking the Mms6 protein from magnetotactic bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 343, 65–70.
- 15 Arakaki, A., Yamagishi, A., Fukuyo, A., Tanaka, M., Matsunaga, T., 2014. Coordinated functions of Mms proteins define the surface structure of cubo-octahedral magnetite crystals in magnetotactic bacteria. *Mol. Microbiol.* 93, 554–567.
- Arató, B., Szányi, Z., Flies, C., Schüller, D., Frankel, R.B., Buseck, P.R., Pósfai, M., 2005. Crystal-size and shape distributions of magnetite from uncultured magnetotactic bacteria as a potential biomarker. *Am. Mineral.* 90, 1233–1241.
- 20 Bazylnski, D.A., Frankel, R.B., 2004. Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (3), 217–230.
- Beijnen, J. H. Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution. *Int. J. Pharm* 32, 123–131 (1986).
- 25 Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:631-51. Review.
- De Jong WH, Borm PJA Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards *Int J Nanomedicine.* 2008;3:133–149.
- Bird, S.M., Rawlings, A.E., Galloway, J.M., Staniland, S.S., 2016a. Using a biomimetic membrane surface experiment to investigate the activity of the magnetite biomineralisation protein Mms6. *RSC Adv.* 6, 7356.
- 30 El Shafei, G. M. S. & Moussa, N. A. Adsorption of Some Essential Amino Acids on Hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* 238, 160–166 (2001).
- Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S., 2012a. Nanomagnetic arrays formed with the biomineralization protein Mms6. *J. Nano Res.* 2012 (17), 127–146.
- 35

- Galloway, J.M., Bramble, J.P., Rawlings, A.E., Burnell, G., Evans, S.D., Staniland, S.S., 2012b. Biotemplated magnetic nanoparticle arrays. *Small* 8, 204–208.
- Iafisco, M., Varoni, E., Di Foggia, M., Pietronave, S., Fini, M., Roveri, N., Rimondini, L., Prat, M., 2012. Conjugation of hydroxyapatite nanocrystals with human immunoglobulin G for
5 nanomedical applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 90, 1-7.
- Iafisco, M., Delgado-Lopez, J.M., Varoni, E.M., Tampieri, A., Rimondini, L., Gomez-Morales, J., Prat, M. 2013. Cell surface receptor targeted biomimetic apatite nanocrystals for cancer therapy. *Small* 25, 9 (22), 3834-3844.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, C., Rodriguez-Navarro, A., Perez-Gonzalez, T.,
10 Bazylinski, D. A., Lauer, H. V., Romanek, Jr. C. S. 2012. Signatures in magnetites formed by (Ca,Mg,Fe)CO₃ thermal decomposition: Terrestrial and extraterrestrial implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 87, 69–80.
- Kolinko, I., Lohße, A., Borg, S., Raschdorf, O., Jogler, C., Tu, Q., Pósfai, M., Tompa, E., Plitzko, J., Brchmann, A., Wanner, G., Müller, R., Zhang, Y., Schüller, D., 2014. Biosynthesis of
15 magnetic nanostructures in a foreign organism by transfer of bacterial magnetosome gene clusters. *Nat. Nanotechnol.* 9, 193–197.
- Langmuir, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc* 40, 1361–1403 (1918).
- Lisy, M.R., Hartung, A., Lang, C., Schüler, D., Richter, W., Reichenbach, J.R., Kaiser, W. A.,
20 Hilger, I., 2007. Fluorescent bacterial magnetic nanoparticles as bimodal contrast agents. *Invest. Radiol.* 42 (4), 235–241.
- Luo, Q. & Andrade, J. D. Cooperative Adsorption of Proteins onto Hydroxyapatite. *J. Colloid Interface Sci.* 200, 104–113 (1998).
- Martín Ramos, J.D. X Powder, a software package for powder X-ray diffraction analysis. *Legal*
25 *Deposit GR 1001/04* (2004).
- Maruyama, K., Takeyama, H., Nemoto, E., Tanaka, T., Yoda, K., Matsunaga, T., 2004. Single nucleotide polymorphism detection in aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene using bacterial magnetic particles based on dissociation curve analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 687–694.
- 30 Maruyama, K., Takeyama, H., Mori, T., Ohshima, K., Ogura, S., Mochizuki, T., Matsunaga, T., 2007. Detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) using a fully automated system with a nano-scale engineered biomagnetite. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2282–2288.
- Matsunaga, T., Suzuki, T., Tanaka, M., Arakaki, A., 2007. Molecular analysis of magnetotactic
35 bacteria and development of functional bacterial magnetic particles for nano-biotechnology. *Trends. Biotechnol.* 25, 182–188.

- Oltolina, F., Gregoletto, L., Colangelo, D., Gómez-Morales, J., Delgado-López, J. M., Prat, M. 2015. Monoclonal Antibody-Targeted Fluorescein-5-isothiocyanate-Labeled Biomimetic Nanoapatites: A Promising Fluorescent Probe for Imaging Applications. *Langmuir*, 31 (5), 1766–1775.
- 5 Ota, H., Lim, T.K., Tanaka, T., Yoshino, T., Harada, M., Matsunaga, T., 2006. Automated DNA extraction from genetically modified maize using aminosilane-modified bacterial magnetic particles. *J. Biotechnol.* 125, 361–368.
- Perez-Gonzalez, T.C., Jimenez-Lopez, C., Neal, A.L., Rull-Perez, F., Rodríguez-Navarro, A., Fernandez-Vivas, A., Iañez-Pareja, E., 2010. Magnetite biomineralization induced by
10 *Shewanella oneidensis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74 (3), 967–979.
- Prozorov, T., Mallapragada, S.K., Narasimhan, B., Wang, L., Palo, P., Nilsen-Hamilton, M., Williams, T.J., Bazylnski, D.A., Prozorov, R., Canfield, P.C., 2007. Protein-mediated synthesis of uniform superparamagnetic magnetite nanocrystals. *Adv. Funct. Mater.* 17, 951–957.
- Prozorov, T., Bazylnski, D.A., Mallapragada, S.K., Prozorov, R., 2013. Novel magnetic
15 nanomaterials inspired by magnetotactic bacteria: topical review. *Mater.Sci. Eng. R* 74, 133–172.
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D., Li, M., 1999. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 215, 190–192.
- 20 Rawlings, A.E., Bramble, J.P., Walker, R., Bain, J., Galloway, J.M., Staniland, S.S., 2014. Self-assembled MmsF proteinosomes control magnetite nanoparticle formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 16094–16099.
- Rill, C., Kolar, Z. I., Kickelbick, G., Wolterbeek, H. T. & Peters, J. A. Kinetics and thermodynamics of adsorption on hydroxyapatite of the [160Tb]terbium complexes of the
25 bone-targeting ligands DOTP and BPPED. *Langmuir* 25, 2294–301 (2009).
- Rodríguez-Ruiz, I. et al. pH-responsive delivery of doxorubicin from citrate-apatite nanocrystals with tailored carbonate content. *Langmuir* 29, 8213–21 (2013).
- Schüler D., Scheffel, A. (2010) Method for the recombinant production of magnetic nanoparticles. Patent US2010/0292495 A1.
- 30 Schwertmann, U., Cornell, R.M., 2000. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*, 2nd ed., vol. 188. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Schwertmann, U., Murad, E., 1990. The influence of aluminum on iron oxides: XIV. Aluminum substituted magnetite synthesized at ambient temperatures. *Clays Clay Miner.* 38, 196–202.
- Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.*
35 2009;86:215-23. Review.

- Sun, J.B., Duan, J.H., Dai, S.L., Ren, J., Guo, L., Jiang, W., Li, Y., 2008. Preparation and antitumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Biotechnol. Bioeng.* 101 (6), 1313–1320.
- 5 Thomas-Keprta, K.L., Bazylinski, D.A., Kirschvink, J.L., Clemett, S.J., McKay, D.S., Wentworth, S.J., Vali, H., Gibson Jr., E.K., Romanek, C.S., 2000. Elongated prismatic magnetite crystals in ALH84001 carbonate globules: potential Martian magnetofossils. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64 (23), 4049–4081.
- Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, Khaw BA, Klibanov AL, Rammohan R, Samokhin
10 GP, Whiteman KR. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1511:397-411.
- Tseng, J.-Y., Chang, C.-W., Chen, Y.-H., Chang, C.-F., Chiang, P.-C., 2007. Synthesis of micro-size magnetic polymer adsorbent and its application for the removal of Cu(II) ion.
15 *Colloids Surf. A*, 209–216.
- Turiel, E., Perez-Conde, C. & Martin-Esteban, A. Assessment of the cross-reactivity and binding sites characterisation of a propazine-imprinted polymer using the Langmuir-Freundlich isotherm. *Analyst* 128, 137–41 (2003).
- Valverde-Tercedor, C., Montalbán-López, M., Perez-Gonzalez, T., Sanchez-Quesada, M.S.,
20 Prozorov, T., Pineda-Molina, E., Fernandez-Vivas, M.A., Rodriguez-Navarro, A.B., Trubitsyn, D., Bazylinski, D.A., Jimenez-Lopez, C., 2015. Size control of in vitro synthesized magnetite crystals by the MamC protein of *Magnetococcus marinus* strain MC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5109–5121.
- Vayssières, L., Chanèac, C., Tronc, E., Jolivet, J.P., 1998. Size tailoring of magnetite particles
25 formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *J. Colloid Interface Sci.* 205, 205–212.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene:
 - (i) una fase mineral pura de magnetita biomimética superparamagnética;
 - 5 (ii) MamC; y
 - (iii) opcionalmente, Mms6;donde, al menos los componentes (i) y (ii) forman nanopartículas magnéticas superparamagnéticas que contienen hasta 5% en peso de MamC (BMNPs mediadas por MamC se componen entonces de ~95% en peso de magnetita y ~5% en peso de MamC), con
10 un tamaño medio de partícula entre 30-120 nm, punto isoeléctrico de ~4,4, área superficial de ~ 90 m²/g, temperatura de bloqueo de ~145 K y temperatura de irreversibilidad de ~292 K.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que no hay siderita en la composición a niveles detectables y $\leq 5\%$ de goetita.
15

3. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tamaño medio de la partícula es de 30-50 nm.

4. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las
20 nanopartículas magnéticas biomiméticas se funcionalizan con un agente terapéutico, preferiblemente con un agente quimioterapéutico, más preferentemente doxorubicina.

5. La composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas magnéticas biomiméticas se funcionalizan con una sustancia señalizante,
25 preferentemente con un anticuerpo monoclonal.

6. Una formulación para hacer magnetoliposomas que engloba:
 - (i) la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
 - (ii) un agente que forma liposomas; y
 - 30 (iii) opcionalmente magnetitas inorgánicas superparamagnéticas (MNPs).

7. La formulación de magnetoliposomas de acuerdo con la reivindicación 6, donde los liposomas se funcionalizan con un agente terapéutico y/o con una sustancia señalizante.

- 35 8. Una composición farmacéutica que engloba la composición de la presente invención o la formulación de los magnetoliposomas de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable y/o diluyente.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la formulación de los magnetoliposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para usarse como medicamento.

5

10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la formulación de los magnetoliposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para usarse en tratamientos contra el cáncer.

10

11. La composición, la formulación de los magnetoliposomas o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el cáncer se selecciona se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, cáncer gástrico, tumor cerebral y cuello, linfoma de Hodgkin, linfoma de no-Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de riñón, mieloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón no microcítico, sarcoma de tejidos blandos, timomas, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga de células transicionales, tumor de Wilms, macroglobulinemia de Waldenström.

15

12. Un método para producir una composición de una fase mineral sustancialmente pura de magnetita biomimética superparamagnética que comprende los siguientes pasos:

20

(a) preparar una solución de carbonato;

(b) añadir FeCl_3 a la solución de carbonato;

(c) agregar MamC y, opcionalmente, Mms6 a la solución obtenida en el paso (b);

25

(d) incubar la solución obtenida en el paso (c) durante al menos 30 minutos;

(e) añadir $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$ a la solución obtenida en el paso (d) y

(f) ajustar el pH de la solución obtenida en el paso (e) a pH 9 usando una base;

Donde el método se realiza a 25 °C y 1 atmósfera de presión y todas las soluciones utilizadas son previamente desoxigenadas.

30

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la solución carbonatada consiste en NaHCO_3 y Na_2CO_3 y, opcionalmente, la base es NaOH.

35

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde la concentración final de la solución obtenida en el paso (f) es 3,5 mM NaHCO_3 , 3,5 mM Na_2CO_3 , 2,78 mM $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$, 5,56 mM FeCl_3 y una cantidad variable de MamC y, opcionalmente, Mms6.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, donde la concentración de los reservorios de proteínas en solución son $[MamC] = 2-5 \text{ mg/mg}$, $[Mms6]$ y $[Mms7] > 1 \text{ mg/mL}$.
- 5 16. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, la formulación de los magnetoliposomas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-7 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para la preparación de un agente de contraste para técnicas clínicas de imagen, preferentemente técnicas de imagen de resonancia magnética.
- 10 17. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.
18. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como biosensor o como separador molecular.

<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	STYATREPAIPIKIKLAKSISGAWDIPACPKQPSAAKAKKAKKAAQIANKNSGDK	43
<i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2MAYAGLAQAGSY	15
<i>Magnetovibrio blakemorei</i>	9
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> AMB-1	RPDLIAN.....GVICPPKRPAGTND	21
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	MPAQIDP.....GVICPPKRPAGTND	22
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1MVCPEGVVYVTKA	13
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1 v2	MPAQIDP.....GVICPPGVVYVTKA	21
<hr/>		
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	YCTPLPAMTAAWDAIAPKAAPIAKSEKIMAASTAKVYFAS.....KQYKAAFLANPA	113
<i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2A.....AGANFIRMTFVDAVAKKGLAAEPLKAS-FA.....	64
<i>Magnetovibrio blakemorei</i>	0
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> AMB-1AMVSEKRSKAAE---AGAMFTR-ARKGTVAKQGTAAPEYVAT---AVAAFA	65
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1AAGCSEKRSKAAK---AGAAKPSAAAKTGAUAKTILAKTQVAT---AVAAFA	70
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1AALGSEKRSKATP---VSGKVV---AAPEKAAEFAATFA	49
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1 v2AALGSEKRSKATP---VSGKVVAGGVAAKAGAAFAAAGAGT-KVVAAGS	70
<hr/>		
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	STYATY.....ATSEAV.....KASAAAPYAAATPSTLGLIAGAPFLIIS	108
<i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2KMPFPAKAAFMIAAKKATMIAAKGUVVGLGLAGAPFLIIVK	90
<i>Magnetovibrio blakemorei</i>MAYMQLVYKPA-FTYKSAAGKFKW---ELGLGLAGAPFLIIV	44
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> AMB-1	AFKAVKAAQVAGT-KVALGKSKA---MIAKYVGGTYWTKNLGLGLAGAPFLIIV	126
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	AFKAVKAAQVAGT-KVALGKSKA---MIAKYVGGTYWTKNLGLGLAGAPFLIIV	127
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1	---GELVYVAGYAKSKAAAVVGVV---KIDPVGGTYWTKNLGLGLAGAPFLIIV	105
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1 v2	AGTKVVAAGGAAKAAAVGVGVV---AGAAVYVSTWGGKLAIALGSELGAPFLIIV	128
<hr/>		
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	VSGAGVYVAVGGPPKAAKSLKAT.....	154
<i>Magnetospirillum</i> sp. QH-2	KSGA---AVYGLAGKSSGPTDASLAKALGTF	153
<i>Magnetovibrio blakemorei</i>	IGAV---AVYGVRSPTAGDQTEKSLAAVYASA	77
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> AMB-1	VSGV---AVYAMKSPKSLKALGPTSLKALA---	157
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	VSGG---AVYAMKSPKSLKALGPTSLKALA---	158
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1	VSGG---AVYAMKSPKSLKALGPTSLKALA---	156
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSB-1 v2	VSGG---AVYAMKSPKSLKALGPTSLKALA---	159

..... aminoácidos cargados negativamente (Asp, Glu)
 ***** aminoácidos que contienen grupos hidroxilo (Tyr, Thr, Ser)

Figura 1

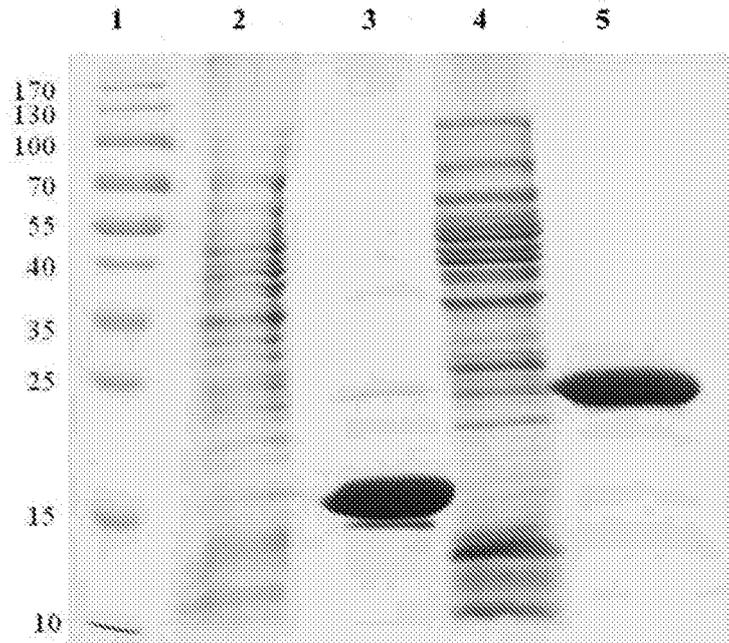


Figura 2

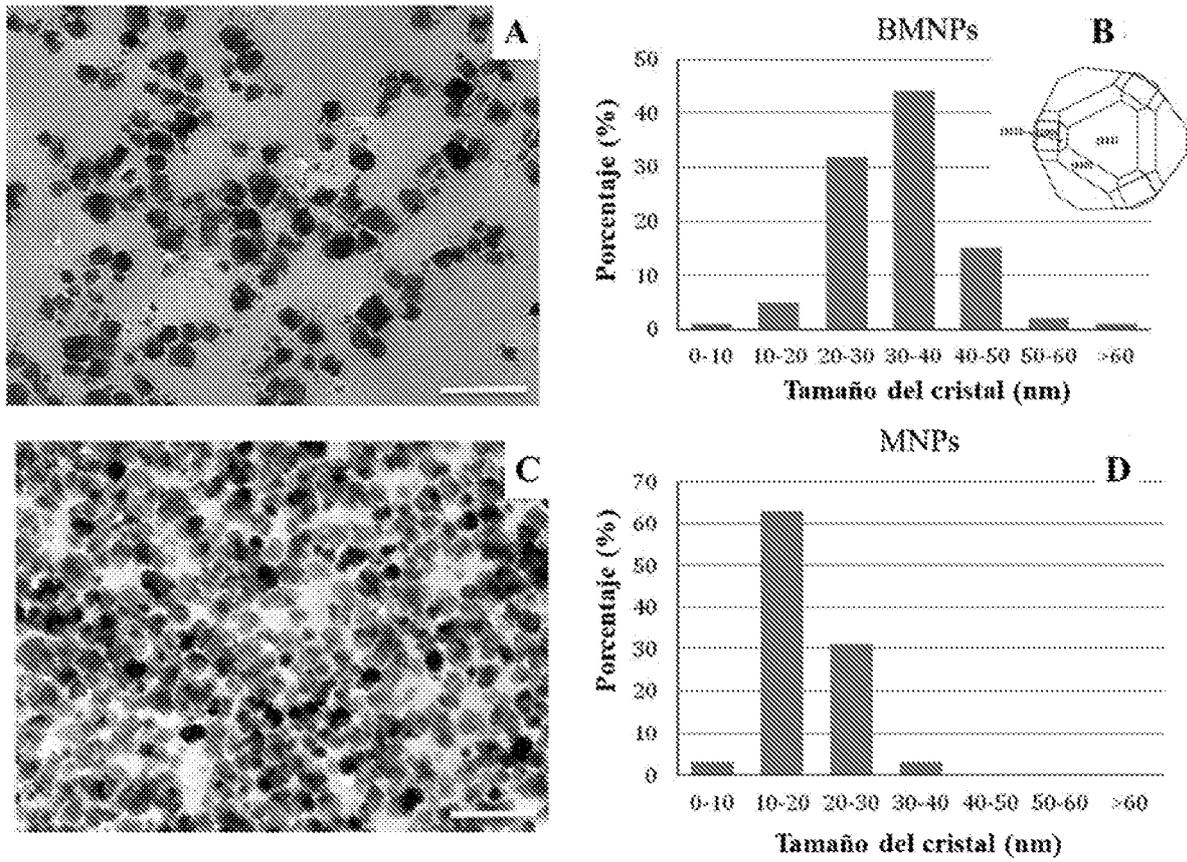


Figura 3

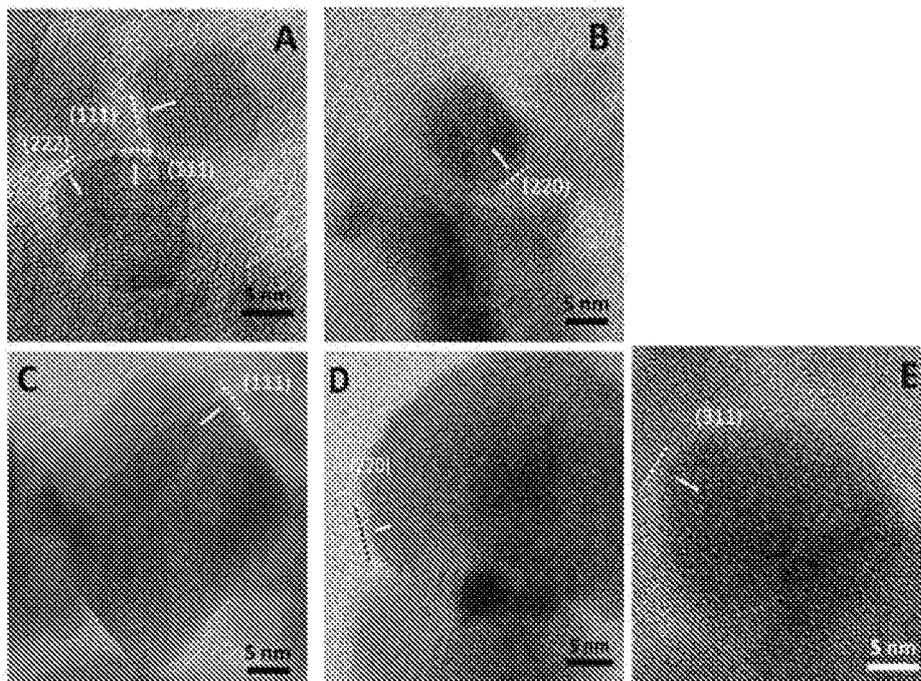


Figura 4

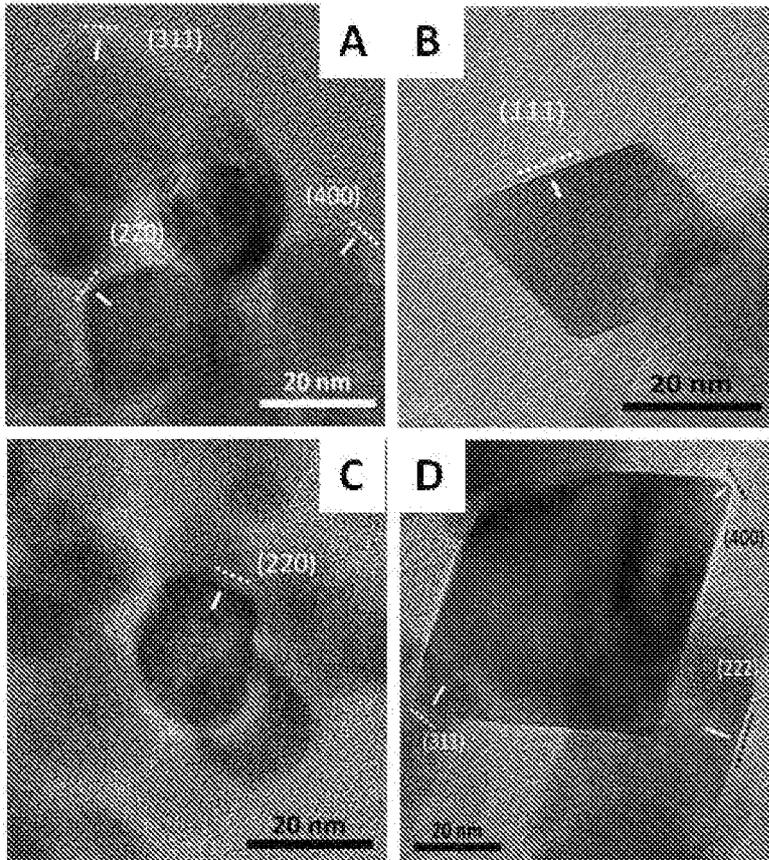


Figura 5

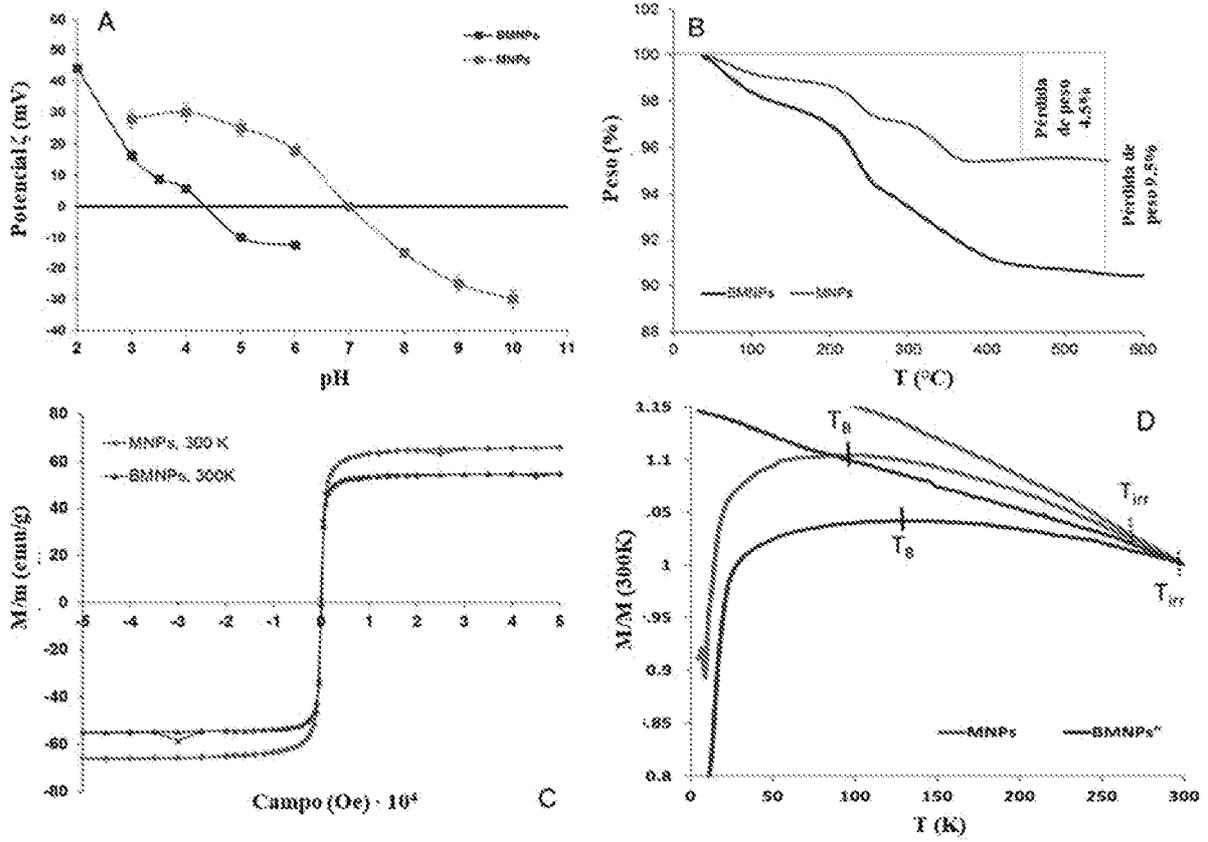


Figura 6

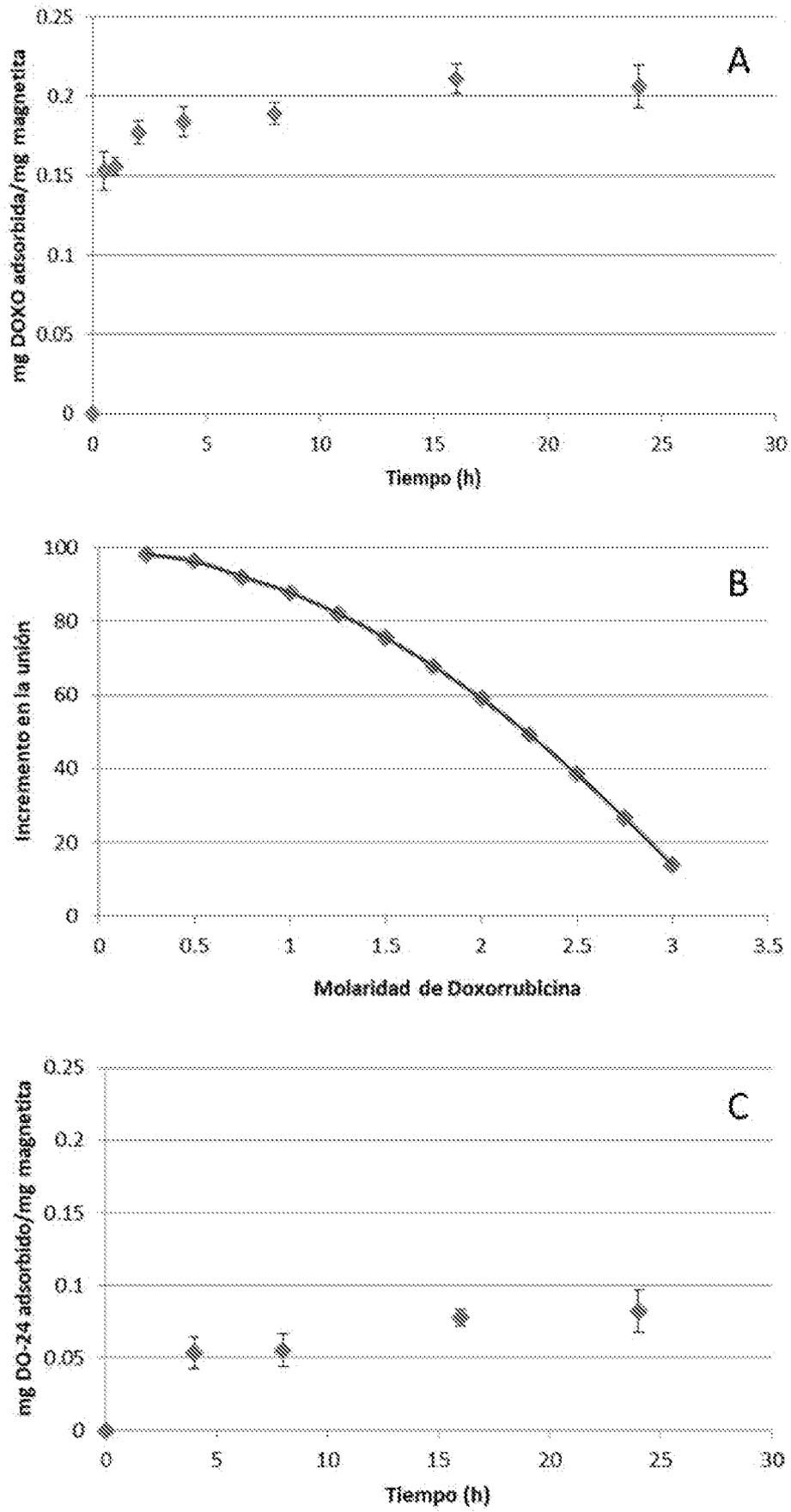


Figura 7

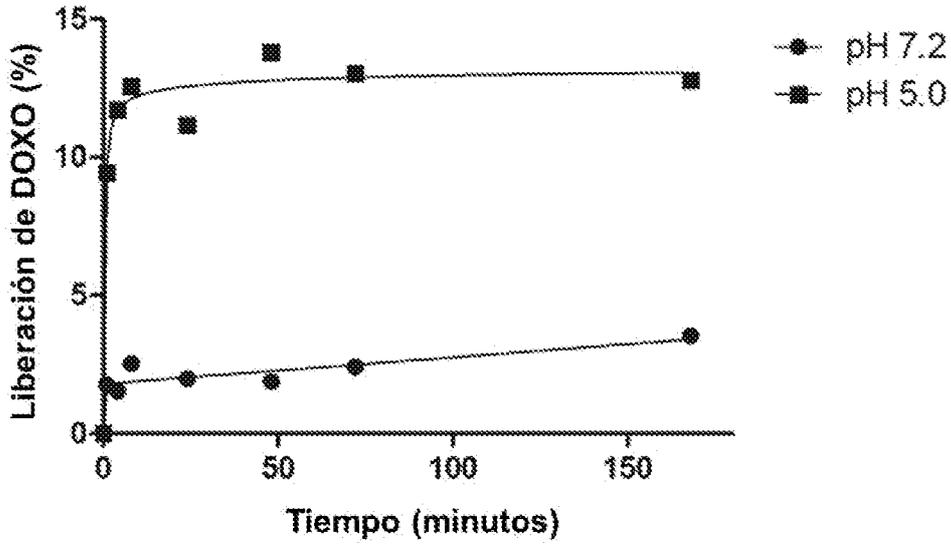


Figura 8

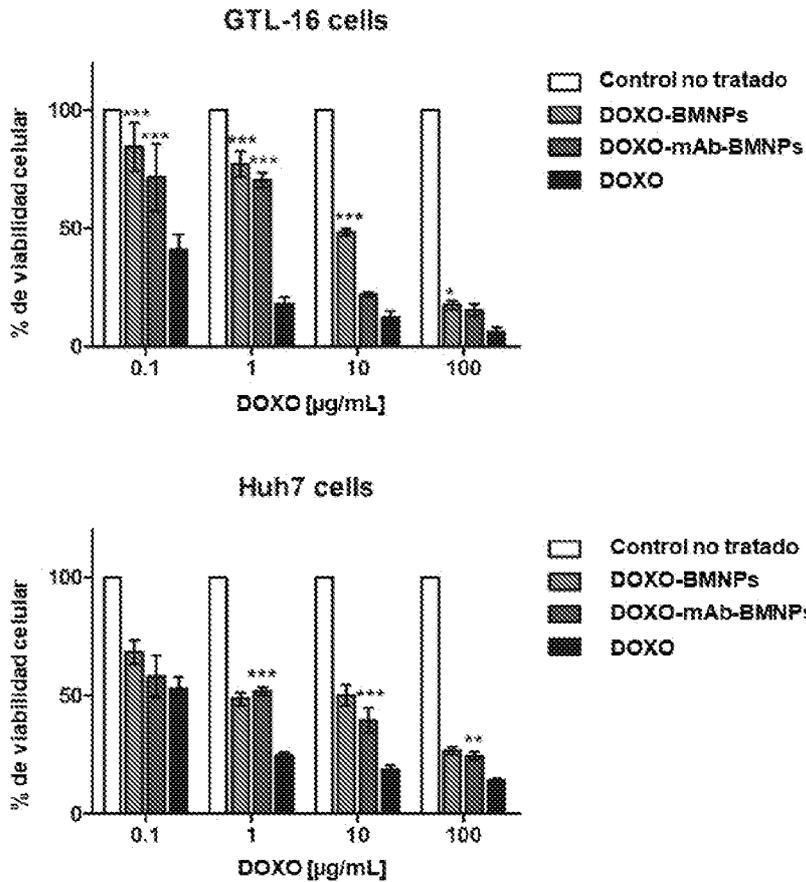


Figura 9

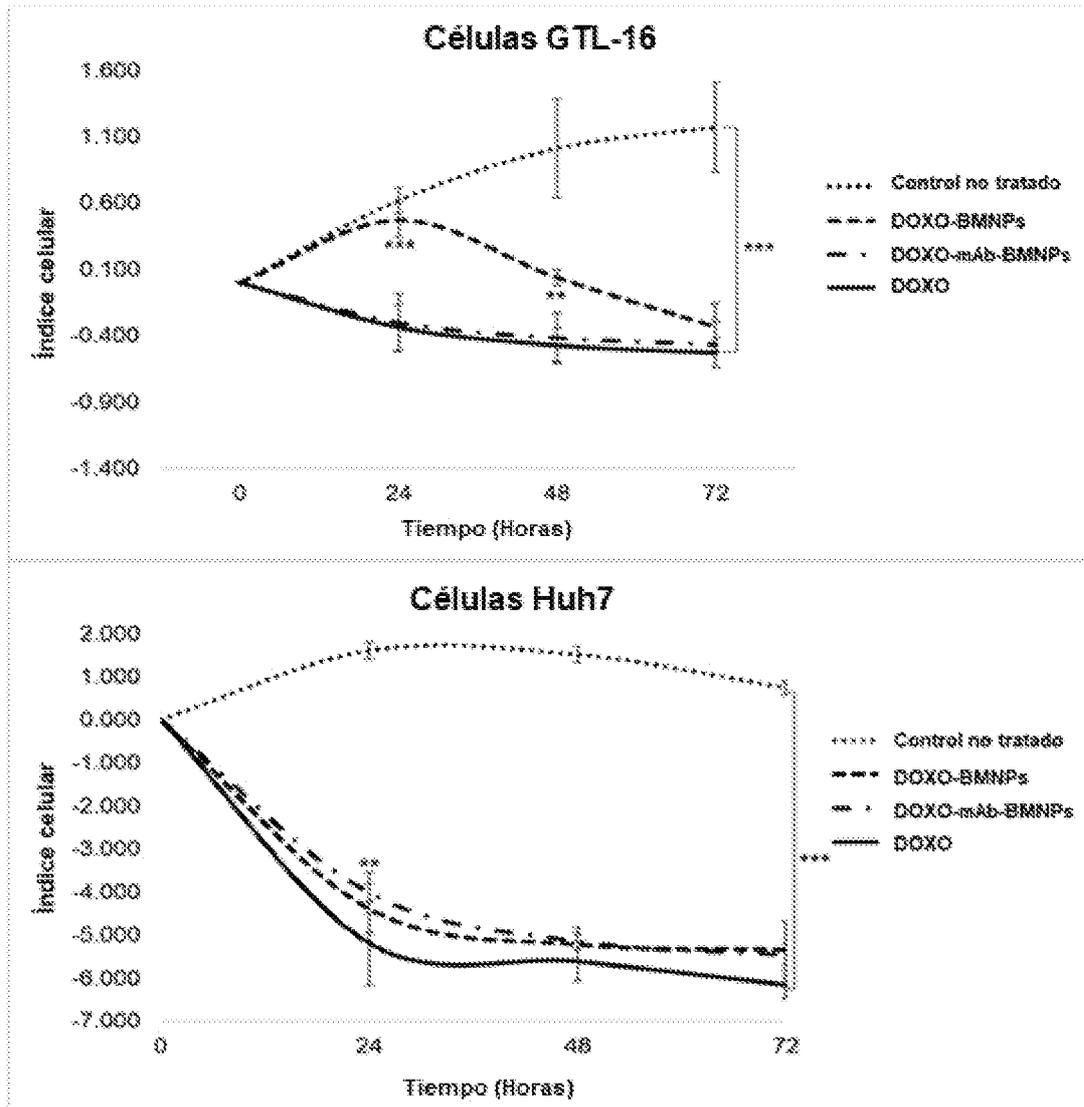


Figura 10

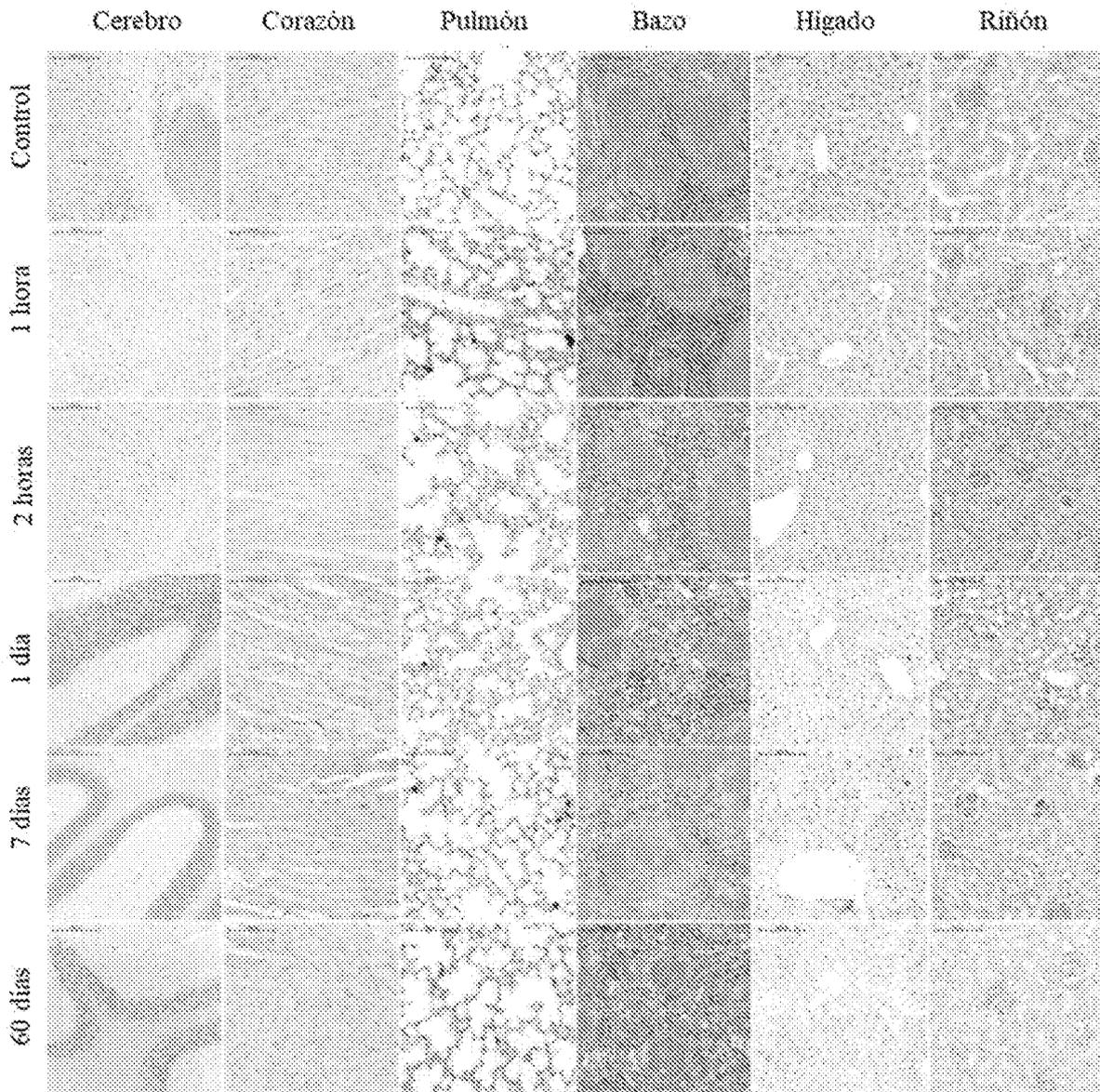


Figura 11