

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 473**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 51/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2016 PCT/US2016/028349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16172146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2016 E 16719682 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3285814**

54 Título: **Obtención de imágenes de macrófagos asociados a tumor**

30 Prioridad:

20.04.2015 US 201562150104 P

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

16.04.2021

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (100.0%)
1275 York Avenue, Box 524
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**PEREZ-MEDINA, CARLOS;
REINER, THOMAS;
LEWIS, JASON S.;
MULDER, WILLEM, J.M.;
FAYAD, ZAHY A. y
FISHER, EDWARD**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 819 473 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Obtención de imágenes de macrófagos asociados a tumor

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud de patente US nº de serie 62/150,104, presentada el 20 de abril de 2015.

10 Campo técnico

La presente invención se refiere de manera general a composiciones y métodos para la obtención de imágenes (“imaging”) de tumores. Más particularmente, en determinadas formas de realización, la invención se refiere a la utilización de nanopartículas de lipoproteína para la obtención de imágenes de macrófagos asociados a tumores.

15

Financiación gubernamental

La presente invención se llevó a cabo con el apoyo gubernamental bajo los números de subvención K25 EB016673 (T.R.), R01 HL118440 (W.J.M.M.), R01 HL125703 (W.J.M.M.) y R01 CA155432 (W.J.M.M.), concedidas por el National Institutes of Health (NIH). El gobierno posee determinados derechos sobre la presente invención.

20

Antecedentes

La inmunología de macrófagos asociados a tumores (TAM) se ha convertido en un campo de investigación activo en los últimos años. Los TAM se consideran una diana prometedora para un tratamiento mejor y personalizado de las neoplasias malignas. Se está empezando a establecer el papel de los TAM en las diferentes etapas de desarrollo tumoral y en la terapia. En el cáncer ovárico, por ejemplo, se ha mostrado que los TAM contribuyen a la progresión tumoral, mientras que en el cáncer de mama (entre otros), la infiltración de TAM se ha relacionado con un mal pronóstico.

25

30

Los TAM son un tipo de fagocitos sanguíneos derivados de monocitos circulantes o macrófagos residentes en tejidos. Su papel complejo en la carcinogénesis generalmente conduce a la progresión de la enfermedad en muchos cánceres, que comparten algunos mecanismos patológicos similares. De esta manera, una carga elevada de TAM se ha asociado con frecuencia a un mal pronóstico. Durante la progresión del cáncer, los monocitos y macrófagos circulantes son atraídos a tumores, en los se diferencian bajo la influencia de un medio de factores de crecimiento y citocinas. En este proceso, los TAM mismos se vuelven moduladores críticos del microambiente tumoral debido a que fomentan el crecimiento tumoral, la supresión inmunitaria, la metástasis y la quimiorresistencia mediante la generación de condiciones inductoras de tumor. La implicación de los TAM en la modulación de la respuesta del sistema inmunitario al crecimiento tumoral ha conducido a terapias con diana en los TAM.

35

40

La obtención de imágenes de los macrófagos para monitorizar la respuesta inflamatoria ha sido un área activa de investigación. Con este fin, se han desarrollado varios materiales nanoparticulados como agentes de obtención de imágenes de los TAM: Entre otros, se han aplicado varias sondas de MRI a base de óxido de hierro, así como liposomas marcados con ⁶⁴Cu/funcionalizados con manosa y nanocuerpos. El documento nº WO2011/044545 da a conocer nanopartículas que comprenden fosfolípidos marcados radioactivamente y apolipoproteína A1 para métodos de obtención de imágenes y diagnósticos. B. Corsico et al. (Journal of Biological Chemistry, 276(2), páginas 16978-16985) y D. Schouten et al. (Molecular Pharmacology, 44: páginas 486-492) dan a conocer apolipoproteína marcada con ¹²⁵I en nanopartículas para la administración dirigida. Aunque los TAM asimismo presentan un elevado valor diagnóstico y pronóstico, la obtención de imágenes de TAM todavía sigue siendo en gran parte territorio inexplorado.

45

50

De esta manera, existe una necesidad de sistemas mejorados y métodos de evaluación de pronóstico y resultado de la terapia de diferentes etapas del desarrollo tumoral. Existe una necesidad además de agentes de obtención de imágenes de TAM específicos y cuantificables, particularmente para la monitorización no invasiva de la inmunología y el tratamiento dirigido de TAM.

55

Sumario

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia comprendida fuera del alcance según las reivindicaciones se proporciona con fines exclusivamente informativos.

60

En la presente memoria se presentan métodos y composiciones para la obtención no invasiva de imágenes de TAM con lipoproteínas de alta densidad discoidales para evaluar el pronóstico y el resultado de la terapia. Los TAM se están investigando crecientemente en la inmunología del cáncer y se consideran una diana prometedora para un tratamiento mejor y personalizado de las neoplasias malignas. Aunque los TAM asimismo presentan un elevado

65

valor diagnóstico y pronóstico, la obtención de imágenes de TAM todavía sigue siendo en gran parte territorio inexplorado. Los agentes/métodos de obtención de imágenes en la presente memoria resultan valiosos para la evaluación *in vivo* no invasiva de la carga de TAM, no únicamente en contextos preclínicos, sino asimismo en contextos clínicos.

De esta manera, en determinadas formas de realización, la invención proporciona composiciones y métodos que utilizan nanopartículas de lipoproteína de alta densidad (HDL) para la obtención de imágenes de TAM. Las moléculas de HDL pueden marcarse con radioisótopos y/o fluoróforos para la visualización *in vivo* mediante PET y/o imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende nanopartículas de lipoproteínas de alta densidad discoidales, comprendiendo las nanopartículas apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos, en el que las nanopartículas se marcan radioactivamente con un radioisótopo mediante la incorporación de ApoA1 modificada con quelante y un radioisótopo, y opcionalmente la incorporación de un fosfolípido modificado con quelante y un radioisótopo (por ejemplo, en el que 0.5% en peso a 1.5% en peso de la nanopartícula es fosfolípido modificado con quelante).

En determinadas formas de realización, la nanopartícula se marca radioactivamente con el radioisótopo mediante ApoA1 modificado con quelante y la nanopartícula comprende el fosfolípido modificado con quelante.

En determinadas formas de realización, la nanopartícula presenta un peso molecular comprendido en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa, medido mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

En determinadas formas de realización, la nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal presenta un diámetro medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 30 nm, medido mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En determinadas formas de realización, el fosfolípido o fosfolípidos comprenden uno o más elementos seleccionados de entre el grupo que consiste en dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina. En determinadas formas de realización, el fosfolípido modificado con quelante comprende 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE).

En determinadas formas de realización, algunos de entre el fosfolípido o fosfolípidos en la nanopartícula son sustituidos eficazmente por el fosfolípido modificado con quelante.

En determinadas formas de realización, la composición comprende un portador.

Se da a conocer además un método de obtención de macrófagos asociados a tumor (TAM) mediante tomografía de emisión de positrones de lipoproteínas de alta densidad (HDL PET), comprendiendo el método: administrar en un sujeto una composición que comprende la nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para permitir que la nanopartícula se acumule en una zona de TAM y detectar el radioisótopo mediante PET tras la acumulación de la nanopartícula en la zona de los TAM.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de la nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal según la reivindicación 1, comprendiendo el método uno o más de (i), (ii) y opcionalmente (iii) y/o (iv): (i) modificar ApoA1 con un quelante, haciendo reaccionar la ApoA1 modificada con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato (u otra fracción, tal como el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr (IV)) e incorporar la ApoA1 modificada con quelante radiomarcado en la nanopartícula, (ii) modificar ApoA1 con un quelante, incorporando la ApoA1 modificada con quelante en la nanopartícula, y hacer reaccionar la ApoA1 modificada con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)), (iii) modificar DSPE (u otro fosfolípido) con un quelante, hacer reaccionar la DSPE modificada (u otro fosfolípido) con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)), e incorporar la DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante radiomarcada en la nanopartícula, y (iv) modificar DSPE (u otro fosfolípido) con un quelante, incorporando la DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante en la nanopartícula, y hacer reaccionar la DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)).

En determinadas formas de realización, se modifica ApoA1 con el quelante, en el que ApoA1 modificada se hace reaccionar con el radioisótopo que comprende una fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)) y en el que la ApoA1 modificada con quelante radiomarcada se incorpora en la

nanopartícula.

5 En determinadas formas de realización, ApoA1 en la nanopartícula se modifica con un quelante, en el que ApoA1 modificada con quelante se incorpora en la nanopartícula, y en el que ApoA1 modificada con quelante se hace reaccionar con el radioisótopo que comprende la fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr (IV)).

10 En determinadas formas de realización, DSPE (u otro fosfolípido) se modifica con el quelante, en el que la DSPE modificada (u otro fosfolípido) se hace reaccionar con el radioisótopo que comprende la fracción oxalato (u otra fracción, de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)) y en el que la DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante radiomarcada se incorpora en la nanopartícula.

15 En determinadas formas de realización, DSPE (u otro fosfolípido) se modifica con el quelante, en el que la DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante se incorpora en la nanopartícula, y en el que DSPE (u otro fosfolípido) modificada con quelante se hace reaccionar con el radioisótopo que comprende la fracción oxalato (u otra fracción de manera que el radioisótopo comprende Zr en su estado Zr(IV)).

20 En determinadas formas de realización, el radioisótopo comprende un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ⁸⁹Zr, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁷Cu, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁴⁹Pm, ⁹⁰Y, ²¹²Bi, ¹⁰³Pd, ¹⁰⁹Pd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁰La, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁶Dy, ⁶⁷Cu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag y ¹⁹²Ir. En determinadas formas de realización, el radioisótopo comprende ⁸⁹Zr.

25 En determinadas formas de realización, el quelante es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en deferoxamina B (DFO), ácido 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diyl)diacético (CB-TE2A), ácido dietilén-triamina-pentaacético (DTPA); ácido 1,4,7, 10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7, 10-tetraacético (DOTA); ácido etilén-diamina-tetraacético (EDTA); ácido etileno-glicolbis(2-aminoetil)-N,N,N',N'- tetraacético (EGTA); ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA); etilén-bis-(2-4 hidroxifenilglicina) (EHPG); 5-Cl-EHPG; 5Br-EHPG; 5-Me-EHPG; 5t-Bu-EHPG; 5-sec-Bu-EHPG; ácido benzodietilén-triamina-pentaacético (benzo-DTPA); dibenzo-DTPA; fenil-DTPA, difenil-DTPA; bencil-DTPA; dibencil-DTPA; ácido bis-2 (hidroxibencil)-etilén-diamina-diacético (HBED) y derivados de los mismos; Ac-DOTA; benzo-DOTA; dibenzo-DOTA; ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N"-triacético (NOTA); benzo-NOTA; benzo-TETA, ligandos de hidroxipiridinonato octadentados (HOPO) (por ejemplo, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)), benzo-DOTMA, donde DOTMA es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotetradecano-1,4,7,10-tetra(metil-tetraacético), benzo-TETMA (por ejemplo, en el que TETMA es ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-(metil-tetraacético)); derivados de ácido 1,3-propilén-diamina-tetraacético (PDTA); ácido trietilén-tetraamina-hexaacético (TTHA); derivados de 1,5,10-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)-tricatecolato (LICAM) y 1,3,5-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)aminometilbenceno (MECAM) y otros quelantes metálicos. En determinadas formas de realización, el quelante comprende deferoxamina B (DFO).

40 En determinadas formas de realización, entre 0.5% en peso y 1.5% en peso de la nanopartícula es un fosfolípido modificado con quelante radiomarcado.

En determinadas formas de realización, no todo el DSPE-DFO incorporado en la nanopartícula está radiomarcado.

45 En determinadas formas de realización, DSPE-DFO se encuentra en exceso sustancial.

50 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal (por ejemplo, con un peso molecular comprendido en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa medido mediante cromatografía de exclusión por tamaños y con un diámetro medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 30 nm según medición mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS)), la nanopartícula que comprende apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos (por ejemplo, dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y/o 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), en el que la nanopartícula se marca radioactivamente con un radioisótopo mediante la incorporación de ApoA1 modificada con quelante y un radioisótopo, y opcionalmente la incorporación de fosfolípido (por ejemplo, 1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)) modificada con quelante y un radioisótopo, en el que 0.5% en peso a 1.5% en peso de la nanopartícula es fosfolípido (por ejemplo, DSPE) modificada con quelante (por ejemplo, algo del DMPC en la nanopartícula se sustituye eficazmente con lípido DSPE modificada con quelante) para la utilización en un método de diagnóstico *in vivo* de una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en el que el diagnóstico *in vivo* comprende: administrar la composición en el sujeto para permitir que la nanopartícula se acumule en una zona de TAM, y detectar el radioisótopo mediante PET tras la acumulación de la nanopartícula en la zona de TAM.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal (por ejemplo, con un peso molecular comprendido en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa medido mediante cromatografía de exclusión por tamaños y con un diámetro medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 30 nm según medición mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS)), la nanopartícula que comprende apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos (por ejemplo, dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y/o 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), en el que la nanopartícula se marca radioactivamente con un radioisótopo mediante la incorporación de ApoA1 modificada con quelante y un radioisótopo, y opcionalmente la incorporación de fosfolípido (por ejemplo, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)) modificada con quelante y un radioisótopo, en el que 0.5% en peso a 1.5% en peso de la nanopartícula es fosfolípido (por ejemplo, DSPE) modificado con quelante (por ejemplo, algo del DMPC en la nanopartícula se sustituye eficazmente por lípido DSPE modificada con quelante) para la utilización en un método de evaluación de pronóstico y resultado terapéutico de diferentes etapas de una enfermedad (por ejemplo, desarrollo tumoral) en un sujeto, en el que la evaluación del pronóstico y el resultado terapéutico comprende: administrar la composición en el sujeto para permitir que la nanopartícula se acumule en una zona de TAM, y detectar el radioisótopo mediante PET tras la acumulación de la nanopartícula en la zona de TAM.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal (por ejemplo, con un peso molecular comprendido en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa medido mediante cromatografía de exclusión por tamaños y con un diámetro medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 30 nm según medición mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS)), la nanopartícula que comprende apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos (por ejemplo, dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y/o 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), en el que la nanopartícula se marca radioactivamente con un radioisótopo mediante la incorporación de ApoA1 modificada con quelante y un radioisótopo, y opcionalmente la incorporación de fosfolípido (por ejemplo, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)) modificado con quelante y un radioisótopo, en el que 0.5% en peso a 1.5% en peso de la nanopartícula es fosfolípido (por ejemplo, DSPE) modificado con quelante (por ejemplo, algo del DMPC en la nanopartícula se sustituye eficazmente con lípido DSPE modificado con quelante) para la utilización en el diagnóstico *in vivo*.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal (por ejemplo, con un peso molecular comprendido en el intervalo de 100 kDa a 400 kDa medido mediante cromatografía de exclusión por tamaños y con un diámetro medio comprendido en el intervalo de 5 nm a 30 nm según medición mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS)), la nanopartícula que comprende apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos (por ejemplo, dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y/o 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), en el que la nanopartícula se marca radioactivamente con un radioisótopo mediante la incorporación de ApoA1 modificada con quelante y un radioisótopo, y opcionalmente la incorporación de fosfolípido modificado con quelante (por ejemplo, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)) y un radioisótopo, en el que entre 0.5% en peso y 1.5% en peso de la nanopartícula es fosfolípido (por ejemplo, DSPE) modificado con quelante (por ejemplo, algo del DMPC en la nanopartícula se sustituye eficazmente con lípido DSPE modificado con quelante) para la utilización en la evaluación del pronóstico y resultado terapéutico de diferentes etapas de una enfermedad (por ejemplo, el desarrollo tumoral).

En determinadas formas de realización, el radioisótopo comprende un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en ^{89}Zr , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{66}Ho , ^{177}Lu , ^{149}Pm , ^{90}Y , ^{212}Bi , ^{103}Pd , ^{109}Pd , ^{159}Gd , ^{140}La , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{67}Cu , ^{105}Rh , ^{111}Ag y ^{192}Ir . En determinadas formas de realización, el radioisótopo comprende ^{89}Zr .

En determinadas formas de realización, el quelante es un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en deferoxamina B (DFO), ácido 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diidiacético (CB-TE2A), ácido dietién-triamina-pentaacético (DTPA); ácido 1,4,7, 10-tetraazacicotetradecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA); ácido

5 etilén-diamina-tetraacético (EDTA); ácido etileno-glicolbis(2-aminoetil)-N,N,N',N'- tetraacético (EGTA); ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA); etilén-bis-(2-4 hidroxifenilglicina) (EHPG); 5-Cl-EHPG; 5Br-EHPG; 5-Me-EHPG; 5t-Bu-EHPG; 5-sec-Bu-EHPG; ácido benzodietilén-triamina-pentaacético (benzo-DTPA); dibenzo-DTPA; fenil-DTPA, difenil-DTPA; bencil-DTPA; dibencil-DTPA; ácido bis-2 (hidroxibencil)-etileno-diamina-diacético (HBED) y derivados de los mismos; Ac-DOTA; benzo-DOTA; dibenzo-DOTA; ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N"-triacético (NOTA); benzo-NOTA; benzo-TETA, ligandos de hidroxipiridinonato octadentados (HOPO) (por ejemplo, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)), benzo-DOTMA, donde DOTMA es ácido 1,4,7,10-tetraazacicotetradecano-1,4,7,10-tetra(metil-tetraacético), benzo-TETMA (por ejemplo, en el que TETMA es ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecano-1,4,8,11-(metil-tetraacético)); derivados de ácido 1,3-propilén-diamina-tetraacético (PDTA); ácido trietilén-tetraamina-hexaacético (TTHA); derivados de 1,5,10-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)-tricatecolato (LICAM) y 1,3,5-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)aminometilbenzeno (MECAM) y otros quelantes metálicos. En determinadas formas de realización, el quelante comprende deferoxamina B (DFO).

15 Breve descripción de los dibujos

Lo anteriormente expuesto y otros objetivos, aspectos, características y ventajas de la presente exposición resultarán evidentes y se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción siguiente considerada haciendo referencia los dibujos adjuntos, en los que:

20 las figuras 1A y 1B representan una estructura y composición de HDL y nanotrazadores de ^{89}Zr -HDL.

La figura 1A representa un esquema de HDL (izquierda), ^{89}Zr -AI-HDL (parte intermedia) y ^{89}Zr -PL-HDL (derecha).

25 La figura 1B representa unas imágenes de microscopía electrónica por transmisión (TEM) de HDL (izquierda), ^{89}Zr -AI-HDL (parte intermedia) y ^{89}Zr -PL-HDL (derecha).

Las figuras 2A-2C representan unos cromatogramas de exclusión por tamaño y estabilidad *in vitro* de nanopartículas de ^{89}Zr -HDL.

30 La figura 2A representa la coelución de HDL solo (línea negra), DFO-ApoA-1@HDL (trazos cortos) y ^{89}Zr -AI-HDL (trazos largos y cortos, línea radioactiva).

35 La figura 2B representa la coelución de DSPE-DFO@HDL al 1% (línea negra) y ^{89}Zr -PL-HDL (trazos, línea radioactiva).

La figura 2C representa la estabilidad sérica *in vitro* de nanopartículas de ^{89}Zr -HDL a 37°C.

Las figuras 3A y 3B representan la farmacocinética y biodistribución de nanopartículas de ^{89}Zr -HDL.

40 La figura 3A representa una curva de tiempo-actividad sanguínea para ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL (n = 3).

La figura 3B representa la distribución de la radioactividad de ^{89}Zr -AI-HDL (panel izquierdo) y ^{89}Zr -PL-HDL (panel derecho) en tejidos seleccionados en ratones portadores de tumores de cáncer de mama ortotópicos.

45 Las figuras 4A y 4B representan la acumulación ejemplificativa de nanotrazadores de ^{89}Zr -HDL en tejidos tumores que pueden visualizarse mediante obtención de imágenes *in vivo* de PET (CT (izquierda) y fusión PET/CT (derecha)).

50 La figura 4A representa imágenes de ^{89}Zr -AI-HDL obtenidas 24 h después de la inyección en ratones portadores de tumores 4T1 ortotópicos (señalados mediante flechas).

La figura 4B representa imágenes de ^{89}Zr -PL-HDL obtenido 24 h después de la inyección en ratones portadores de tumores 4T1 ortotópicos (señalados mediante flechas).

55 La figura 5A representa el análisis histológico *ex vivo* de una sección tumoral 24 h después de la administración de ^{89}Zr -AI-HDL. Están incluidos la tinción con hematoxilina y eosina (parte superior izquierda), la inmunofluorescencia para CD31 (parte superior derecha) e IBA-1 (parte inferior derecha) y la autorradiografía (parte inferior izquierda). La barra de escala es de 2 mm.

60 La figura 5B representa el análisis histológico *ex vivo* de una sección tumoral 24 h después de la administración de ^{89}Zr -PL-HDL. Están incluidos la tinción con hematoxilina y eosina (parte superior izquierda), la inmunofluorescencia para CD31 (parte superior derecha) e IBA-1 (parte inferior derecha) y la autorradiografía (parte inferior izquierda). La barra de escala es de 2 mm.

65 Las figuras 6A-6C muestra que las nanopartículas de HDL preferentemente presentan como diana los TAM.

La figura 6A representa la incorporación de DiO representativa en cinco células inmunitarias, es decir, macrófagos asociados a tumor (TAM), células derivadas de monocitos (células derivadas de Mo), monocitos, células dendríticas (CD) y células T.

La figura 6B representa la incorporación de DiO representativa en células endoteliales (CE) y células tumorales (4T1). Las células de un ratón en el que se ha inyectado PBS sirven de control (histogramas grises, a la izquierda).

La figura 6C representa la cuantificación de la incorporación de DiO presentada como intensidad media de fluorescencia (IMF). Las estadísticas se calcularon con una prueba t de Student de dos colas con varianzas desiguales mediante la comparación con los TAM. * $P < 0.05$.

La figura 7 representa un procedimiento de selección para identificar células en tumores. Se sometieron células individuales vivas al procedimiento de selección anterior a fin de identificar los macrófagos asociados a tumor (TAM), células derivadas de monocitos (células derivadas de Mo), monocitos, células dendríticas (CD), células T, células endoteliales (CE) y células tumorales (4T1).

Definiciones

Con el fin de que la presente exposición resulte más fácilmente entendida, determinados términos en primer lugar se definen a continuación. Se proporcionan definiciones adicionales para los términos siguientes y otros términos siguientes a lo largo de la especificación.

En la presente solicitud, la utilización de “o” significa “y/o”, a menos que se indique lo contrario. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término “comprende” y variaciones del término, tales como “comprendiendo”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas. Tal como se utiliza en la presente solicitud, los términos “en torno a” y “aproximadamente” se utilizan como equivalentes. Cualesquiera numerales utilizados en la presente solicitud con o sin en torno a/aproximadamente cubren cualesquiera fluctuaciones normales apreciadas por el experto ordinario en la materia relevante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente activador” se refiere a un agente cuya presencia o nivel correlaciona con un nivel o actividad elevado de una diana, en comparación con el mismo en ausencia del agente (o con el agente a un nivel diferente). En algunas formas de realización, un agente activador es uno cuya presencia o nivel correlaciona con un nivel o actividad diana que es comparable o superior a un nivel o actividad de referencia particular (por ejemplo, el observado bajo condiciones de referencia apropiadas, tales como la presencia de un agente activador conocido, por ejemplo, un control positivo).

En determinadas formas de realización, el término “en torno a” o “aproximadamente” se refiere a un intervalo de valores que se encuentra a 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (superior o inferior a) respecto al valor de referencia indicado, a menos que se indique lo contrario, o de otro modo resulte evidente a partir del contexto (excepto en el caso de que dicho número exceda de 100% respecto a un valor posible).

El término “administración” se refiere a la introducción de una sustancia en un sujeto. En general, puede utilizarse cualquier vía de administración, incluyendo, por ejemplo, la introducción parenteral (por ejemplo, intravenosa), oral, tópica, subcutánea, peritoneal, intraarterial, inhalación, vaginal, rectal, nasal, introducción en el líquido cerebroespinal, o la instilación en compartimientos corporales. En algunas formas de realización, la administración es oral. Adicional o alternativamente, en algunas formas de realización, la administración es parenteral. En algunas formas de realización, la administración es intravenosa.

El término “agente” se refiere a un compuesto o entidad de cualquier clase química, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, moléculas pequeñas, metales o combinaciones de los mismos. Tal como resultará evidente a partir del contexto, en algunas formas de realización, un agente puede ser o comprender una célula u organismo, o una fracción, extracto o componente del mismo. En algunas formas de realización, un agente es o comprende un producto natural en el aspecto de que se observa y/o se obtiene de la naturaleza. En algunas formas de realización, un agente es o comprende una o más entidades que son artificiales en el aspecto de que han sido diseñadas, manipuladas y/o producidas mediante la acción de la mano del ser humano y/o no se encuentran en la naturaleza. En algunas formas de realización, puede utilizarse un agente en forma aislada o pura; en algunas formas de realización, puede utilizarse un agente en forma bruta. En algunas formas de realización, se proporcionan agentes potenciales en forma de colecciones o bibliotecas, por ejemplo que pueden cribarse para identificar o caracterizar agentes activos en las mismas. Entre algunas formas de realización particulares de agentes que pueden utilizarse se incluyen moléculas pequeñas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, ARNip, ARNh_c, híbridos de ADN/ARN, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, péptidos, miméticos de péptido, ácidos péptido-nucleicos, moléculas pequeñas, etc. En algunas formas de realización, un agente es o comprende un polímero. En algunas formas de realización, un agente contiene por

lo menos una fracción polimérica. En algunas formas de realización, un agente comprende un terapéutico, diagnóstico y/o fármaco.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “aproximadamente” o “en torno a”, tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas formas de realización, el término “aproximadamente” o “en torno a” se refiere a un intervalo de valores que se encuentran a 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o menos en cualquier dirección (superior o inferior a) respecto al valor de referencia indicado, a menos que se indique lo contrario, o de otro modo resulte evidente a partir del contexto (excepto en el caso de que dicho número exceda de 100% respecto a un valor posible).

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “asociado” típicamente se refiere a dos o más entidades en proximidad física entre sí, directa o indirectamente (por ejemplo, mediante una o más entidades adicionales que sirven como agente conector), formando una estructura que es suficientemente estable de manera que las entidades se mantienen en proximidad física bajo condiciones relevantes, por ejemplo, condiciones fisiológicas. En algunas formas de realización, las fracciones asociadas se encuentran unidas covalentemente entre sí. En algunas formas de realización, las entidades asociadas se encuentran unidas no covalentemente. En algunas formas de realización, las entidades asociadas están unidas entre sí mediante interacciones no covalentes específicas (es decir, mediante interacciones entre ligandos interactuantes que discriminan entre su pareja de interacción y otras entidades presentes en el contexto de utilización, tales como, por ejemplo, interacciones de estreptavidina/avidina, interacciones de anticuerpo/antígeno, etc.). Alternativa o adicionalmente, un número suficiente de interacciones no covalentes más débiles puede proporcionar una estabilidad suficiente para fracciones que se mantienen asociadas. Entre las interacciones no covalentes ejemplificativas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, afinidad, coordinación metálica, adsorción física, interacciones de anfitrión-huésped, interacciones hidrofóbicas, interacciones de apilado pi, interacciones de van der Waals, interacciones magnéticas, interacciones electrostáticas, interacciones de dipolo-dipolo, etc.

15 El término “biocompatible”, tal como se utiliza en la presente memoria, pretende describir materiales que no inducen una respuesta perjudicial sustancial *in vivo*. En determinadas formas de realización, los materiales son “biocompatibles” en el caso de que no resulten tóxicos para las células. En determinadas formas de realización, los materiales son “biocompatibles” en el caso de que su adición de las células *in vitro* resulta en un nivel inferior o igual a 20% de muerte celular, y/o su administración *in vivo* no induzca inflamación u otros efectos adversos similares. En determinadas formas de realización, los materiales son biodegradables.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, los materiales “biodegradables” son aquellos que, al introducirlos en células, resultan descompuestos por la maquinaria celular (por ejemplo, por degradación enzimática) o mediante hidrólisis en componentes que las células pueden reutilizar o eliminar sin efectos tóxicos significativos sobre las células. En determinadas formas de realización, los componentes generados mediante descomposición de un material biodegradable no inducen inflamación y/o otros efectos adversos *in vivo*. En algunas formas de realización, los materiales biodegradables se descomponen enzimáticamente. Alternativa o adicionalmente, en algunas formas de realización, los materiales biodegradables se descomponen por hidrólisis. En algunas formas de realización, los materiales poliméricos biodegradables se descomponen en sus polímeros componentes. En algunas formas de realización, la descomposición de materiales biodegradables (incluyendo, por ejemplo, los materiales poliméricos biodegradables) incluye la hidrólisis de enlaces éster. En algunas formas de realización, la descomposición de materiales (incluyendo, por ejemplo, materiales poliméricos biodegradables) incluye el corte de enlaces de uretano.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o las soluciones acuosas salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se utilizan preferentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, de E.W. Martin.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “terapia de combinación” se refiere a aquellas situaciones en las que dos o más agentes farmacéuticos diferentes para el tratamiento de enfermedades se administran en regímenes solapantes de manera que el sujeto se expone simultáneamente a por lo menos dos agentes. En algunas formas de realización, los diferentes agentes se administran simultáneamente. En algunas formas de realización, la administración de un agente se solapa con la administración de por lo menos otro agente. En algunas formas de realización, los diferentes agentes se administran secuencialmente de manera que los agentes presentan una actividad biológica simultánea en el sujeto.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “excipiente” se refiere a un agente no terapéutico que puede incluirse en una composición farmacéutica, por ejemplo para proporcionar o contribuir a una consistencia o efecto estabilizador deseado. Entre los excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa,

lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula biológica “funcional” es una molécula biológica en una forma en la que muestra una propiedad y/o actividad que la caracteriza. Una molécula biológica puede presentar dos funciones (es decir, es bifuncional) o muchas funciones (es decir, es multifuncional).

10 La expresión “*in vitro*” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a sucesos que se producen en un medio artificial, por ejemplo, en una probeta o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, “*in vivo*” se refiere a sucesos que se producen dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano y un animal no humano. En el contexto de los sistemas celulares, el término puede utilizarse para referirse a sucesos que se producen dentro de una célula viva (en lugar de, por ejemplo, sistemas *in vitro*).

20 La expresión “agente de obtención de imágenes” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier elemento, molécula, grupo funcional, compuesto, fragmentos del mismo o fracción que facilite la detección de un agente (por ejemplo, una nanopartícula de polisacárido) al que se une. Entre los ejemplos de agentes de obtención de imágenes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, diversos ligandos, radionucleidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁸F, ¹⁹F, ³²P, ³⁵S, ¹³⁵I, ¹²⁵I, ¹²³I, ⁶⁴Cu, ¹⁸⁷Re, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹⁷⁷Lu, ⁸⁹Zr, etc.), pigmentos fluorescentes (para pigmentos fluorescentes ejemplificativos específicos, ver posteriormente), agentes quimioluminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio, dioxetanos estabilizados y similares), agentes bioluminiscentes, nanocristales semiconductores fluorescentes inorgánicos espectralmente resolubles (es decir, puntos cuánticos), nanoagregados de nanopartículas metálicas (por ejemplo, oro, plata, cobre, platino, etc.), iones metálicos paramagnéticos, enzimas (para ejemplos específicos de enzimas, ver posteriormente), marcajes colorimétricos (tales como, por ejemplo, pigmentos, oro coloidal y similares), biotina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los que se dispone de antisueros o anticuerpos monoclonales.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “nanopartícula” se refiere a una partícula con un diámetro inferior a 1000 nanómetros (nm). En algunas formas de realización, una nanopartícula presenta un diámetro inferior a 300 nm, tal como define la National Science Foundation. En algunas formas de realización, una nanopartícula presenta un diámetro inferior a 100 nm tal como definen los National Institutes of Health. En algunas formas de realización, las nanopartículas son micelas en el aspecto de que comprenden un compartimiento cerrado, separado de la solución en masa por una membrana micelar, que típicamente comprende entidades anfifílicas que circundan y encierran un espacio o compartimiento (por ejemplo, definiendo un espacio). En algunas formas de realización, una membrana micelar comprende por lo menos un polímero, tal como, por ejemplo, un polímero biocompatible y/o biodegradable.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sustancialmente” y equivalentes gramaticales, se refieren a la condición cualitativa de mostrar una extensión o grado total o prácticamente total de una característica o propiedad de interés. El experto ordinario en la materia entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, o nunca, llegan a completarse y/o transcurren hasta completarse o alcanzan o evitan un resultado absoluto.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “sujeto” incluye seres humanos y mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, cerdos, gatos, perros y caballos). En muchas formas de realización, los sujetos son mamíferos, particularmente primates, especialmente seres humanos. En algunas formas de realización, los sujetos son ganado, tal como vacas, ovejas, cabras, bovinos, cerdos y similares; aves, tales como pollos, patos, gansos, pavos y similares, y animales domesticados, particularmente animales de compañía, tales como perros y gatos. En algunas formas de realización (por ejemplo, particularmente en contextos de investigación), los mamíferos sujeto son, por ejemplo, roedores (por ejemplo, ratones, ratas o hámsters), conejos, primates o cerdos, tales como cerdos consanguíneos y similares.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tratamiento” (asimismo “tratar” o “tratando”) se refiere a cualquier administración de una sustancia que alivia, mejora, mitiga, inhibe parcial o completamente, retrasa la aparición y/o reduce la gravedad y/o la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra sólo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastornos y/o afección relevante. En algunas formas de realización, el tratamiento puede ser de un sujeto que ha sido diagnosticado o que sufre de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas formas de realización, el tratamiento puede ser de un sujeto que es conocido que presenta uno o más factores de susceptibilidad que están estadísticamente correlacionados con un riesgo incrementado de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

Descripción detallada

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia comprendida fuera del alcance según las reivindicaciones se proporciona con fines exclusivamente informativos.

Durante toda la descripción, en la que se describen composiciones, artículos y dispositivos que presentan, incluyen o comprenden componentes específicos, o en la que se describen procedimientos y métodos que presentan, incluyen o comprenden etapas específicas, se encuentra contemplado que, adicionalmente, haya composiciones, artículos y dispositivos de la presente invención que consisten esencialmente o consistan en los componentes indicados, y que existen procedimientos y métodos según la presente invención que consisten esencialmente, o consisten en, las etapas de procesamiento indicadas.

De manera similar, en donde se describen composiciones, artículos y dispositivos que presentan, incluyendo o comprenden compuestos y/o materiales específicos, se encuentra contemplado que, adicionalmente, haya composiciones, artículos y dispositivos de la presente invención que consisten esencialmente, o consisten en, los compuestos y/o materiales indicados.

En la presente memoria se describen principios naturales con diana en macrófagos naturales y bionanopartículas radiomarcadas específicas de TAM basadas en lipoproteínas de alta densidad (HDL). Una lipoproteína es una partícula natural compuesta de proteínas y lípidos. Las lipoproteínas ayudan a las grasas a desplazarse por el agua dentro y fuera de las células, emulsionando las moléculas de lípidos. Una lipoproteína de alta densidad (HDL) es una nanopartícula biológica que transporta grasas dentro del cuerpo y presenta un papel importante en el sistema de transporte inverso del colesterol. Existen varias subclases de HDL que difieren en la composición de lípidos y proteínas (apolipoproteínas). La apolipoproteína principal observada en HDL es la apolipoproteína 1 (ApoA1), a través de la cual se une a varios receptores membranales que se expresan abundantemente sobre los macrófagos. Las HDL pueden utilizarse para la obtención de imágenes moleculares de resonancia magnética de la aterosclerosis, de los macrófagos de placa, o para administrar un fármaco antiinflamatorio en lesiones ateroscleróticas con gran especificidad. La densidad de las HDL habitualmente es superior a 1.063 g/ml (por ejemplo, medido mediante ultracentrifugación combinada con electroforesis).

En la presente memoria se describe además (por ejemplo, para permitir la utilización de HDL para la obtención de imágenes de PET cuantitativa de los TAM) un diseño, síntesis y evaluación farmacocinética de dos nanopartículas diferentes de HDL modificadas con ⁸⁹Zr (HDL). Específicamente, se marcó la carga de fosfolípidos de ApoA1 o HDL y se examinó el transporte dirigido de ⁸⁹Zr-TAM del agente utilizando análisis de imágenes de PET *in vivo* y *ex vivo*, incluyendo la inmunohistoquímica. Adicionalmente, se preparó un marcador sustitutivo fluorescente para las partículas de ⁸⁹Zr-HDL radiomarcadas, que se utilizó para investigar la distribución intercelular de dicha clase de partículas mediante citometría de flujo. Al inyectarlo por vía intravenosa en un modelo de ratón ortotópico de cáncer, la diana tumoral principal de dicho marcador sustitutivo son los TAM, seguido de células derivadas de monocitos y células dendríticas.

En la presente memoria se describen agentes de obtención de imágenes específicas y cuantificables de TAM para la utilización en la evaluación de la eficacia de las terapias dirigidas a TAM y que facilitan el pronóstico de los cánceres controlados por TAM. Las presentes formas de realización proporcionan, entre otras cosas, determinadas lipoproteínas marcadas con radioisótopos, sus usos y métodos de síntesis.

Pueden prepararse determinadas composiciones proporcionadas, tales como nanopartículas de HDL radiomarcadas, mediante la incorporación de un nucleido emisor de positrones de larga vida (por ejemplo, un radioisótopo), ⁸⁹Zr, en una lipoproteína (HDL) que comprende fosfolípidos y apolipoproteínas. En algunas formas de realización, las nanopartículas están compuestas del fosfolípido DMPC y apolipoproteína 1 (ApoA1) en una proporción en peso de 2.5:1. En algunas formas de realización, un nucleido emisor de positrones puede formar complejo con un quelante conjugado con un fosfolípido o apolipoproteínas. En algunas formas de realización, ⁸⁹Zr forma complejo con DFO, se conjuga con un fosfolípido o proteína ApoA1, generando ⁸⁹Zr-PL-HDL y ⁸⁹Zr-AI-HDL, respectivamente. En algunos ejemplos experimentales presentados en la presente memoria, la evaluación *in vivo* se llevó a cabo en modelos de ratón ortotópico de cáncer de mama y se incluyeron en análisis farmacocinéticos, estudios de biodistribución y obtención de imágenes de PET. Asimismo se llevó a cabo un análisis histológico *ex vivo* de tejidos tumorales para evaluar la distribución regional de la radioactividad de ⁸⁹Zr. Se utilizaron análogos fluorescentes de los agentes marcados radioactivamente para determinar la especificidad celular mediante citometría de flujo.

En algunas formas de realización, los fosfolípidos que comprenden HDL comprenden dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y/o 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término

“fosfolípido” incluye derivados de fosfolípido (incluyendo derivados de fosfolípido naturales y sintéticos). En algunas formas de realización, las apolipoproteínas que comprenden HDL comprenden apolipoproteína 1 (ApoA-1). En algunas formas de realización, una proporción en peso de fosfolípido y proteína puede ser de entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 3:1, de entre aproximadamente 2.2:1 y aproximadamente 2.8:1, de entre aproximadamente 2.3:1 y aproximadamente 2.7:1 o de entre aproximadamente 2.4:1 y aproximadamente 2.6:1.

En algunas formas de realización, las nanopartículas de HDL pueden marcarse radioactivamente mediante incorporación de apolipoproteínas modificadas con quelante e radioisótopos y/o la incorporación de fosfolípidos modificados con quelante e radioisótopos. En algunas formas de realización, las apolipoproteínas modificadas con quelante comprenden ApoA1-deferoxamina B (DFO). En algunas formas de realización, los fosfolípidos modificados con quelante comprenden DMPC-DFO y DSPE-DFO.

En algunas formas de realización, las nanopartículas de HDL discoidales pueden sintetizarse mediante:

- (i) modificación de una o más apolipoproteínas con un quelante y haciendo reaccionar las apolipoproteínas modificadas con un radioisótopo que comprende una fracción reactiva con el quelante, y la incorporación de las apolipoproteínas modificadas con quelante radiomarcadas en la nanopartícula,
- (ii) modificación de una o más apolipoproteínas con un quelante, incorporando las apolipoproteínas modificadas con quelante en la nanopartícula y haciendo reaccionar las apolipoproteínas modificadas con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción reactiva con el quelante,
- (iii) modificación de uno o más fosfolípidos con un quelante, haciendo reaccionar los fosfolípidos modificados con un radioisótopo que comprende una fracción reactiva con el quelante e incorporando los fosfolípidos modificados con quelante marcados radioactivamente en la nanopartícula, o
- (iv) modificación de uno o más fosfolípidos, incorporando los fosfolípidos modificados con quelante en la nanopartícula, y haciendo reaccionar los fosfolípidos modificados con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción reactiva con el quelante.

En algunas formas de realización, los radioisótopos comprenden ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{149}Pm , ^{90}Y , ^{212}Bi , ^{103}Pd , ^{109}Pd , ^{159}Gd , ^{140}La , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{67}Cu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{89}Zr y ^{192}Ir .

En determinadas formas de realización, la nanopartícula comprende un quelante, por ejemplo, ácido 1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecán-4,11-diacético (CB-TE2A); desferoxamina (DFO); ácido dietilén-triamín-pentaacético (DTPA); ácido 1,4,7,10-tetraazacicotetradecán-1,4,7,10-tetraacético (DOTA); ácido etilén-diamín-tetraacético (EDTA); ácido etilén-glicolbis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA); ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecán-1,4,8,11-tetraacético (TETA); etilén-bis-(2-4 hidroxifenilglicina) (EHPG); 5-Cl-EHPG; 5Br-EHPG; 5-Me-EHPG; 5t-Bu-EHPG; 5-sec-Bu-EHPG; ácido benzodietilén-triamín-pentaacético (benzo-DTPA); dibenzo-DTPA; fenil-DTPA, difenil-DTPA; bencil-DTPA; dibencil-DTPA; ácido bis-2 (hidroxibencil)-etilén-diamín-diacético (HBED) y derivados de los mismos; Ac-DOTA; benzo-DOTA; dibenzo-DOTA; ácido 1,4,7-triazacilononán-N,N',N'-triacético (NOTA); benzo-NOTA; benzo-TETA, benzo-DOTMA, en el que DOTMA es ácido 1,4,7,10-tetraazacicotetradecán-1,4,7,10-tetra(metil-tetraacético), benzo-TETMA, en el que TETMA es ácido 1,4,8,11-tetraazacicotetradecán-1,4,8,11-(metil-tetraacético); derivados de ácido 1,3-propilén-diamín-tetraacético (PDTA); ácido trietilén-tetraamín-hexaacético (TTHA); derivados de 1,5,10-N,N',N'-tris(2,3-dihidroxibenzoil)-tricatecolato (LICAM) y 1,3,5-N,N',N'-tris(2,3-dihidroxibenzoil)aminometilbenzeno (MECAM), u otros quelantes metálicos.

En algunas formas de realización, la incorporación de radioisótopos puede no presentar un efecto medible sobre el tamaño en comparación con HDL sin radioisótopos. En algunas formas de realización, el radiomarcado de quelantes modificados puede ser estable para llevar a cabo la visualización *in vivo*, presentando asociación permanente de radioisótopos a una fracción de nanopartículas.

En algunas formas de realización, las nanopartículas radiomarcadas pueden visualizarse *in vivo* mediante PET/CT. En algunas formas de realización, las nanopartículas radiomarcadas pueden incluir un fluoróforo (por ejemplo, un fluoróforo en el infrarrojo cercano), visualizarse *in vivo* mediante PET e imágenes de fluorescencia de infrarrojo cercano.

En algunas formas de realización, las nanopartículas de HDL pueden presentar un peso molecular comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 100 kDa y aproximadamente 400 kDa, de entre aproximadamente 125 kDa y aproximadamente 375 kDa, o de entre aproximadamente 150 kDa y aproximadamente 350 kDa según medición mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

En algunas formas de realización, las nanopartículas de HDL pueden presentar un diámetro medio comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 5 nM y aproximadamente 40 nM, de entre aproximadamente 5 nM y 30 nM, o de entre aproximadamente 5 nM y 20 nM según medición mediante dispersión de luz dinámica.

En algunas formas de realización, el tiempo de residencia en sangre de las nanopartículas de HDL (por ejemplo, en ratones) puede ser de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 20 horas, de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 15 horas, de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 10 horas, de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 8 horas, de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 6 horas, de entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 6 horas, de entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 8 horas, de entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 10 horas, de entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 15 horas, o de entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 20 horas. Sin respaldo teórico particular, el tiempo de residencia en sangre puede reflejar el comportamiento de componentes en la HDL natural. Por ejemplo, los fosfolípidos transportados mediante intercambio de HDL con otras lipoproteínas antes de que finalmente resulten eliminadas de la circulación al transportarse hasta sus dianas. Las nanopartículas de HDL con una tasa neta de internalización y/o catabólica baja pueden presentar tiempos de circulación prolongados.

En algunas formas de realización, la incorporación tumoral (por ejemplo, el cáncer de mama de ratón) de las nanopartículas de HDL puede alcanzar un pico entre aproximadamente 12 horas y aproximadamente 60 horas, entre aproximadamente 18 horas y aproximadamente 54 horas, entre aproximadamente 21 horas y aproximadamente 51 horas, o entre aproximadamente 24 horas y aproximadamente 48 horas después de la inyección.

Las nanopartículas de HDL pueden detectarse en órganos. Sin respaldo teórico particular, la acumulación de nanopartículas de HDL puede observarse en donde el órgano procesa el catabolismo. La acumulación de actividad en el componente mineral del hueso puede resultar en la liberación de radioisótopo respecto de su quelante.

Pueden obtenerse imágenes de los TAM mediante tomografía de emisión de positrones de lipoproteínas de alta densidad (HDL PET). En algunas formas de realización, pueden obtenerse imágenes de TAM mediante la administración en el sujeto de una composición que comprende las nanopartículas de lipoproteína de alta densidad discoidales, permitiendo que las nanopartículas se acumulen en una zona de TAM (por ejemplo, esperando un periodo de tiempo) y detectando el radioisótopo mediante PET después de la acumulación de las nanopartículas en la zona de los TAM.

Las composiciones de obtención de imágenes que incorporan nanopartículas de HDL indicadas en la presente memoria pueden administrarse de acuerdo con cualquier vía y régimen apropiados. Las composiciones indicadas en la presente memoria pueden administrarse por cualquier vía, tal como apreciará el experto en la materia. En algunas formas de realización, las composiciones indicadas en la presente memoria se administran por vía oral (PO), intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea (SC), intraventricular, transdérmica, interdérmica, intradérmica, rectal (PR), vaginal, intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), tópica (por ejemplo, mediante polvos, pomadas, cremas, geles, lociones y/o gotas), mucosal, intranasal, bucal, entérica, vítea, sublingual; mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial y/o inhalación; en forma de un spray oral, spray nasal y/o aerosol, y/o mediante un catéter en la vena portal.

40 Ejemplos experimentales

Ejemplo 1: radiomarcado de nanopartículas de HDL

El presente ejemplo demuestra enfoques ejemplificativos de marcaje de HDL, incluyendo: (1) la unión del radiomarcado a Apo-AI, el componente de apolipoproteína principal de HDL, y (2) el radiomarcado de la carga de fosfolípido de la partícula, tal como se muestra en las figuras 1A y 1B. Se seleccionó ⁸⁹Zr como el radioisótopo para el presente ejemplo porque su semivida física (78.2 h) se corresponde con la prolongada semivida biológica de las HDL.

Compuestos químicos:

Los fosfolípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids y 1-(4-isotiocianatofenil)-3-[6,17-dihidroxi-7,10,18,21-tetraoxo-27-[N-acetilhidroxilamino)-6,11,17,22-tetraazaheptaeicosano]tiourea (DFO-p-NCS) de Macrocyclics. Los pigmentos perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina (DiO) y éster de NHS de cianina 5 se adquirieron de Life Technologies y Lumiprobe, respectivamente. Se separó ApoA1 del plasma humano utilizando un protocolo establecido. Los anticuerpos para la citometría de flujo se adquirieron de eBiosciences, Biolegend y BD Bioscience. Todos los demás reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Síntesis de fosfolípido-quelante DSPE-DFO:

Se hicieron reaccionar 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) y 1-(4-isotiocianatofenil)-3-[6,17-dihidroxi-7,10,18,21-tetraoxo-27-[N-acetilhidroxilamino)-6,11,17,22-tetraaza-heptaeicosano]tiourea (DFO-p-NCS) en una mezcla 1:1 de dimetilsulfóxido/cloroformo en presencia de dietilpropilamina a 50°C durante 48 h bajo una atmósfera de nitrógeno. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se evaporó el cloroformo y se añadió agua junto con una solución 1 M de Tris. La mezcla se agitó durante 30 min y se filtró. El sólido se lavó con Tris 1 M, agua y diclorometano, para producir el compuesto deseado en forma de un sólido blanco con un rendimiento de 70% a 80%.

Preparación de HDL:

Se prepararon HDL mediante la mezcla de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC) y ApoA1 en una proporción en peso de 2.5:1. Se formó una película de lípido mediante evaporación de una solución de cloroformo que contenía el fosfolípido. Después de la hidratación con PBS a una temperatura de 35°C a 40°C y la sonicación se llevó a cabo la adición de la cantidad requerida de ApoA1. La sonicación sobre hielo durante 10 minutos proporcionó una solución ligeramente turbia que se mantuvo a 37°C durante la noche. La posterior centrifugación a 4000 rpm durante 5 min y la filtración a través de un filtro de 0.22 µm proporcionó una solución clara de HDL. Para la preparación de DSPE-DFO@HDL al 1%, se añadió la cantidad requerida del fosfolípido-quelante DSPE-DFO (1) a expensas de DMPC y se siguió el mismo procedimiento. Lo anterior dio como resultado partículas discoidales con un diámetro hidrodinámico medio de 8.7 ± 0.9 nm (n=6), según medición mediante DLS.

Modificación de HDL con desferrioxamina B:

Se añadió DFO-p-NCS (disuelto en DMSO, 5 mg/ml) en etapas de 5 µl a una solución de HDL en tampón de PBS 0.1 M, pH 8.2, que contiene típicamente 2 mg de ApoA1 por ml. La mezcla se sometió a agitación con vórtex después de cada adición hasta alcanzar un exceso molar de 2 veces de DFO-p-NCS respecto a ApoA1 y después se incubó durante 2 horas a 37°C. Se separaron las partículas respecto de DFO-p-NCS no reaccionado libre por filtración mediante centrifugación utilizando tubos de Vivaspin 500 de 10 kDa de peso molecular de corte (MWCO) (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Alemania) a 15000 rpm. El concentrado se lavó 4 veces con 500 µl de PBS, pH 7.4, y se diluyó hasta el volumen final con PBS. Se midió el número de marcajes por cada molécula de ApoA1 en 1.4 ± 0.3 (n=3) utilizando el método de dilución isotópica. La DFO-ApoA1@HDL resultante presentaba un diámetro de 8.9 ± 1.1 nm (n=5).

Radioquímica:

Se produjo ^{89}Zr en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center en un ciclotrón EBCO TR19/9 de energía de haz variable (EbcO Industries Inc., British Columbia, Canadá) mediante la reacción de $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ y se purificó de acuerdo con métodos anteriormente publicados, rindiendo ^{89}Zr con una actividad específica de 195-497 MBq/µg. Se llevaron a cabo mediciones de la actividad utilizando un calibrador de dosis Capintec CRC-15R (Capintec, Ramsey, NJ).

Radiomarcado de ApoA-I en HDL (^{89}Zr -AI-HDL):

Se preparó una solución de ^{89}Zr en PBS mediante la mezcla de 100 µl de PBS con el volumen correspondiente de solución de oxalato de ^{89}Zr en ácido oxálico 1 M y se ajustó a pH 7.1 - 7.4 con Na_2CO_3 1 M. A continuación, se añadió el marcaje del precursor de HDL DFO-ApoA1 en HDL en forma de una solución en PBS que contenía 2 mg de ApoA1/ml. Se preparó la mezcla de marcaje en una proporción de actividad-a-ApoA1 de 1 mCi/mg de ApoA1 y se incubó a 37°C durante 2 h. El posterior aislamiento mediante filtración mediante centrifugación utilizando tubos de Vivaspin 500 de 10 kDa de MWCO y lavado con PBS (4x500 µl) proporcionó ^{89}Zr -AL-HDL radioquímicamente puro. El retenido se diluyó con PBS y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm antes de utilizarlo.

Radiomarcado de fosfolípido en HDL (^{89}Zr -PL-HDL):

Se obtuvo ^{89}Zr -PL-HDL siguiendo el mismo procedimiento indicado anteriormente, utilizando el precursor de marcaje correspondiente, DSPE-DFO@HDL al 1%. Se obtuvo DSPE-DFO@HDL al 1% con un diámetro medio de 8.6 ± 1.3 nm (n=5).

La modificación no presentó ningún efecto medible sobre el tamaño (medido mediante el aparato NanoSeries Z-Sizer (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) en comparación con HDL solo (tabla 1). En ambos casos (es decir, ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL), el radiomarcado de los precursores modificados resultó en la asociación permanente del radioisótopo a una fracción de partículas de un peso molecular estimado de 150 kDa. Dicho peso molecular concuerda con el peso molecular esperado de HDL discoidal.

La tabla 1, a continuación, ilustra la composición (en % molar), tamaño y carga superficial de HDL, ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL.

Tabla 1

	ApoA1	DMPC	DSPE-DFO	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
HDL	1%	99%	-	8.7 ± 0.9	-14.6 ± 3.2
^{89}Zr -AI-HDL	1%	99%	-	8.5 ± 1.1	-16.2 ± 1.6
^{89}Zr -PL-HDL	1%	98%	1%	8.5 ± 0.8	-13.5 ± 6.6

60 Nanopartículas de HDL fluorescentes:

Se mezclaron fosfolípidos (DPMC) y DiO en solución de cloroformo en una proporción en peso de 99:1. Se formó una película delgada mediante evaporación del solvente y se prepararon vesículas de gran tamaño mediante hidratación de la película con solución de apoA-1. Se crearon partículas de tamaño pequeño mediante un procedimiento de sonicación ultrasónica y se eliminaron los agregados grandes mediante centrifugación y filtración.

HPLC y radio-HPLC:

Se llevó a cabo la HPLC en un sistema de HPLC de Shimadzu dotado de dos bombas LC-10AT y un detector de matriz de fotodiodos SPD-M10AVP. Se llevó a cabo la radio-HPLC utilizando un detector de radio-TCL/HPLC ScanRAM de Lablogix. Se llevó a cabo cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 10/300 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA) utilizando PBS como eluyente con un caudal de 1 ml/min.

Preparación para microscopía electrónica por transmisión (TEM):

El solvente a base de PBS original de las nanopartículas se sustituyó por un tampón de acetato amónico. A continuación, las partículas se mezclaron con un tampón de fosfotungstato sódico al 2% (pH=7.4) para conseguir una tinción negativa. La solución mixta se añadió a rejillas de TEM, se secó y se obtuvieron imágenes con un sistema Hitachi H7650 conectado a una cámara digital de Scientific Instruments and Applications controlada por el software Maxim CCD. Se utilizó una magnificación de factor cien mil para capturar las imágenes.

Ejemplo 2: estabilidad sérica *in vitro* de nanopartículas de HDL radiomarcadas

El presente ejemplo muestra un ensayo ejemplificativo de estabilidad *in vitro* de nanopartículas de HDL marcadas con ^{89}Zr en suero, tal como se muestra en las figuras 2A-2C, que muestran que las nanopartículas son estables para el ensayo *in vivo*.

Se añadió una muestra de la preparación de HDL radiomarcada correspondiente (típicamente 1.5-2.0 MBq en 40 a 60 μl de PBS) a 400 μl de PBS. La mezcla se incubó a 37°C durante 24 h. Se extrajeron alícuotas de 0.3-0.4 MBq en puntos temporales predeterminados (30 min, 2 h, 4 h, 8 h y 24 h) para el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño mediante integración cuidadosa de los picos.

Para ^{89}Zr -AI-HDL, se detectó un pico nuevo que eluía en el mismo tiempo de retención que ApoA1 libre. La proporción entre ^{89}Zr -AI-HDL y dicha especie se mantuvo en gran medida constante durante el tiempo (Tabla 2). Se observó otra especie con un peso molecular superior a 300 kDa en todos los puntos temporales. ^{89}Zr -PL-HDL mostró un comportamiento dinámico similar y asimismo se observó un pico correspondiente a partículas de mayor tamaño con un peso molecular superior a 300 kDa en todos los puntos temporales. Cabe destacar que no era detectable actividad directamente asociada a la albúmina hasta las 8 h y, en cualquier caso, la mayor parte ($63.3 \pm 1.5\%$) se mantuvo unida a las partículas de HDL (figura 1C). La liberación de especies radiomarcadas de pequeño tamaño era detectable tras 24 h para ^{89}Zr -AI-HDL ($5.5 \pm 0.7\%$, $n=3$) y tras 2 h para ^{89}Zr -PL-HDL ($3.3 \pm 0.6\%$, $n=3$, alcanzando después $11.7 \pm 6.4\%$, $n=3$, tras 24 h). Lo anterior podría deberse a la liberación de ^{89}Zr a partir de su complejo de DFO o como resultado de la degradación del enlace de tiourea en presencia de especies cloradas oxidantes (19), resultando en el desprendimiento de la unidad de ^{89}Zr -DFO. En conjunto, dichos datos sugieren que tanto ^{89}Zr -AI-HDL como ^{89}Zr -PL-HDL son suficientemente estables para permitir una adecuada evaluación *in vivo*.

Las diferencias de tiempo de residencia en sangre reflejan el diferente comportamiento de ambos componentes en HDL natural. La ^{89}Zr -AI-HDL con proteína marcada mostró una semivida en sangre significativamente más larga (5.7 h) en comparación con la semivida de 2.0 h observada para ^{89}Zr -PL-HDL. Es bien conocido que los fosfolípidos transportados por HDL se intercambian por otras lipoproteínas antes de que finalmente resulten eliminadas de la circulación durante el transporte dirigido a sus dianas. Por otra parte, la internalización y tasa catabólica netas de ApoA1 son muy bajas, alargando de esta manera su tiempo de circulación en comparación con la nanopartícula con fosfolípido marcado. En consecuencia, la semivida de la radioactividad asociada a ^{89}Zr -AI-HDL aparentemente se corresponde con la lenta renovación de HDL en el organismo.

Ejemplo 3: farmacocinética y biodistribuciones de nanopartículas de HDL radiomarcadas

El presente ejemplo muestra unas farmacocinética y biodistribución ejemplificativas de nanopartículas de HDL radiomarcadas, indicando que las nanopartículas no únicamente se transportan pasivamente, sino que asimismo son distribuidas activamente y están gobernadas por su función biológica natural.

Cultivo celular:

La línea celular de cáncer de mama de ratón 4T1 se obtuvo de la ATCC (Manassas, VA) y se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/l de L-glucosa, suero de feto bovino inactivado por calor al 10% (vol/vol), 100 IU de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina, y se adquirió de la instalación de preparación de medios de cultivo en el Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC New York, NY).

Animales:

Se obtuvieron ratones NCr desnudos atímicos homocigóticos hembra de Taconic Laboratories (Hudson, NY), mientras que se adquirieron ratones C57BL/6 (B6) hembra del Charles Rivers Laboratory (Wilmington, MA). Para las inyecciones ortotópicas, se anestesiaron ratones con 150 mg/kg de quetamina y 15 mg/kg de cóctel de xilazina (10 µl) y se realizó una incisión sobre la almohadilla grasa mamaria tras la esterilización de la zona. A continuación, se inyectaron células 4T1 (1×10^6 células en 100 µl de DMEM) en la almohadilla grasa mamaria antes de sellar la incisión (Vetbond, 3M, St. Paul, MN) y se cultivaron los tumores durante 8 días. Para todas las inyecciones intravenosas, los ratones se calentaron suavemente con una lámpara térmica, se introdujeron en un fijador, se esterilizó la cola con almohadillas con alcohol y se realizó la inyección en la vena lateral de la cola.

Experimentos farmacocinéticos:

En ratones Ncr hembra sanos (8 a 10 semanas de edad, n=6) se inyectaron 1.22 ± 0.02 MBq (intervalo de 1.21 a 1.26 MBq; 30 a 40 µg de ApoA1) de preparación de ^{89}Zr -HDL en 200 µl de solución de PBS. Se muestreó sangre a partir de la vena sávena en puntos temporales predeterminados (5 min, 30 min, 2 h, 8 h, 24 h y 48 h) y se midió la radioactividad en un contador gamma automático Wizard² 2470 (Perkin Elmer, Waltham, MA). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y se calculó el nivel de radioactividad como porcentaje medio de dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g) \pm S.D. El valor ponderado de semivida ($t_{1/2}$) medido para ^{89}Zr -AI-HDL era de 5.7 h, prácticamente 3 veces mayor que el mostrado por ^{89}Zr -PL-HDL, cuyo $t_{1/2}$ era de 2.0 h, tal como se muestra en la figura 3A.

Experimentos de biodistribución:

Se llevaron a cabo experimentos de biodistribución en ratones Black 6 hembra (6-10 semanas de edad, n=20) portadores de tumores mamarios 4T1 ortotópicos. La preparación de HDL radiomarcada (1.35 ± 0.05 MBq, intervalo de 1.28 a 1.42 MBq; 35-40 µg de ApoA1, en 200 µl de solución de PBS) se administró mediante la vena lateral de la cola y se dejó que circulase durante diversos puntos temporales (2 h, 24 h y 48 h) y después se sacrificaron los ratones y se perfundieron los órganos. El contenido radioactivo en los tejidos de interés (sangre, tumor, intestino grueso y delgado, estómago, riñones, cerebro, hueso, hígado, pulmones, corazón, piel, bazo, vejiga y cola) se midió utilizando un contador gamma automático 2470 Wizard2 (Perkin Elmer, Waltham, MA) y se calculó la actividad asociada a los tejidos como porcentaje medio de dosis inyectada por cada gramo de tejido (%DI/g) \pm S.D.

Se muestra una selección de tejidos en la figura 3B para ambas formulaciones y puede encontrarse una lista completa de valores en las tablas 2 y 3, posteriormente. La mayor parte de la radioactividad se mantiene en la sangre 2 h después de la inyección (p.i.). Asimismo se observó una acumulación significativa en riñones ($16.4 \pm 2.1\%$ DI/g [^{89}Zr -AI-HDL] y $13.1 \pm 1.6\%$ DI/g [^{89}Zr -PL-HDL]), hígado (nivel significativamente más elevado para ^{89}Zr -PL-HDL [$14.1 \pm 1.5\%$ DI/g] que para ^{89}Zr -AI-HDL [$7.51 \pm 2.21\%$ DI/g]), y, en menor grado, bazo ($5.0 \pm 1.2\%$ DI/g y $7.2 \pm 0.4\%$ DI/g, respectivamente). La incorporación tumoral en dicho punto temporal era inferior a 5% para ambos trazadores.

A las 24 h p.i., los niveles de actividad sanguínea habían caído a 5.30 ± 0.94 y 2.19 ± 0.23 %DI/g para ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL, respectivamente. Podía observarse un incremento drástico de la incorporación tumoral para ^{89}Zr -AI-HDL, alcanzando $16.5 \pm 2.8\%$ DI/g, mientras que el de ^{89}Zr -PL-HDL era de $8.6 \pm 1.3\%$ DI/g. La incorporación renal era elevada para ambos nanotrazadores, aunque significativamente más elevada para ^{89}Zr -AI-HDL, con $21.2 \pm 1.9\%$ DI/g. Cabe destacar que la actividad del hueso completo para ^{89}Zr -PL-HDL se había incrementado a $15.5 \pm 1.9\%$ DI/g en dicho punto temporal. El hígado y el bazo todavía conservaban un nivel significativo de actividad.

A las 48 h p.i., permanecía menos de 1% ID/g en circulación (0.98 ± 0.25 vs $0.49 \pm 0.06\%$ DI/g para ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL, respectivamente). La incorporación hepática, de bazo y riñones era estadísticamente idéntica para ambos enfoques de radiomarcado. De manera similar, la incorporación tumoral era de $12.3 \pm 4.5\%$ DI/g para ^{89}Zr -AI-HDL y de $12.0 \pm 4.7\%$ DI/g para ^{89}Zr -PL-HDL. La discrepancia más grande en los perfiles de biodistribución a las 48 h siguió siendo la incorporación ósea, que era de $17.1 \pm 4.8\%$ DI/g para ^{89}Zr -PL-HDL y se mantuvo en $2.70 \pm 0.62\%$ DI/g para ^{89}Zr -AI-HDL. $3.6 \pm 1.1\%$ de la incorporación (^{89}Zr -PL-HDL) se origina en médula ósea, dejando $96.4 \pm 1.1\%$ asociado al hueso mineral, mientras que para ^{89}Zr -AI-HDL, la fracción originada en la médula ósea era de $27.8 \pm 4.1\%$.

La elevada acumulación de radioactividad se observó en los riñones, especialmente para ^{89}Zr -AI-HDL. Los riñones desempeñan un papel importante en el catabolismo de ApoA1, en donde es asimilado y degradado (27). Sin respaldo teórico particular, ApoA1 podría filtrarse a través de las membranas basales glomerulares, seguido de la incorporación en los túbulos proximales, permitiendo la endocitosis de las proteínas de HDL (28). De hecho, una tasa de filtración glomerular más elevada está asociada a niveles bajos de HDL y ApoA1 en el ser humano (29).

La incorporación tumoral era elevada para ambas formulaciones, alcanzando un máximo de $16.5 \pm 2.8\%$ DI/g a las 24 h p.i. para ^{89}Zr -AI-HDL, y de $12.0 \pm 4.7\%$ DI/g a las 48 h para ^{89}Zr -PL-HDL.

Se observó una elevada acumulación de radioactividad en los huesos de ratones en los que se había inyectado ^{89}Zr -PL-HDL. Para ^{89}Zr -AI-HDL, la incorporación en huesos completos se mantuvo inferior a 4%DI/g en todos los

puntos temporales, aunque se observó un incremento progresivo para $^{89}\text{Zr-PL-HDL}$, alcanzando 17 %DI/g a las 48 h p.i. Lo anterior está asociado principalmente al hueso mineral para ambas sondas, ya que menos de 5% y 30% de la actividad ósea total había sido incorporada por la médula ósea para $^{89}\text{Zr-PL-HDL}$ y $^{89}\text{Zr-AI-HDL}$, respectivamente. La elevada acumulación de actividad en el componente mineral del hueso se ha informado para otros agentes marcados con ^{89}Zr de circulación prolongada (30, 31), resultando aparentemente de la liberación de ^{89}Zr respecto de su quelante (32). Estos datos concuerdan en gran medida con las firmas respectivas de las imágenes de PET, tal como se muestra en el ejemplo 4.

La tabla 2, a continuación, ilustra la distribución de la radioactividad en los tejidos de $^{89}\text{Zr-AI-HDL}$ en ratones C57BL/6 (B6) hembra portadores de tumores de cáncer de mama 4T1 ortotópicos. Los datos se presentan como % medio ID/g \pm SD ($n \geq 3$ para cada punto temporal).

Tabla 2

Tejido	2 h	24 h	48 h
Sangre	34.5 \pm 6.9	5.30 \pm 0.94	0.98 \pm 0.25
Tumor	4.53 \pm 0.76	16.5 \pm 2.8	12.3 \pm 4.5
Corazón	2.67 \pm 0.81	3.05 \pm 0.17	2.23 \pm 0.57
Pulmones	1.34 \pm 0.60	2.14 \pm 0.65	1.63 \pm 0.53
Hígado	7.51 \pm 2.21	14.6 \pm 0.54	12.8 \pm 4.5
Vesícula biliar	5.47 \pm 1.85	5.18 \pm 2.75	2.86 \pm 1.83
Bazo	5.02 \pm 1.20	8.44 \pm 0.27	5.65 \pm 1.73
Páncreas	2.23 \pm 1.96	1.39 \pm 0.38	1.03 \pm 0.32
Estómago	1.68 \pm 0.35	1.97 \pm 0.07	1.54 \pm 0.17
Intestino delgado	2.22 \pm 0.53	2.67 \pm 0.37	1.72 \pm 0.38
Intestino grueso	1.90 \pm 0.39	4.71 \pm 0.10	3.87 \pm 0.67
Riñón	16.4 \pm 2.1	21.2 \pm 1.87	18.1 \pm 4.3
Músculo	1.27 \pm 0.45	1.23 \pm 0.36	0.75 \pm 0.27
Hueso	3.60 \pm 0.71	3.32 \pm 0.04	2.70 \pm 0.62
Piel	1.90 \pm 0.91	2.18 \pm 0.09	3.91 \pm 2.11

La tabla 3, a continuación, ilustra la distribución de la radioactividad en los tejidos de $^{89}\text{Zr-PL-HDL}$ en ratones C57BL/6 (B6) hembra portadores de tumores de cáncer de mama 4T1 ortotópico. Los datos se presentan como % medio ID/g \pm SD ($n \geq 3$ para cada punto temporal).

Tabla 3

Tejido	2 h	24 h	24 h
Sangre	23.7 \pm 1.51	2.19 \pm 0.23	0.49 \pm 0.06
tumor	3.78 \pm 0.50	8.55 \pm 1.30	12.0 \pm 4.7
Corazón	1.68 \pm 0.10	1.26 \pm 0.16	1.61 \pm 0.25
Pulmones	1.58 \pm 0.72	1.34 \pm 0.46	1.43 \pm 0.50
Hígado	14.1 \pm 1.50	13.6 \pm 2.5	15.2 \pm 2.5
Vesícula biliar	43.5 \pm 19.9	2.27 \pm 0.91	0.69 \pm 0.20
Bazo	7.24 \pm 0.44	5.37 \pm 1.23	6.48 \pm 1.97
Páncreas	1.25 \pm 0.67	0.90 \pm 0.27	0.80 \pm 0.24
Estómago	1.47 \pm 0.31	1.32 \pm 0.02	1.14 \pm 0.18
Intestino delgado	2.93 \pm 0.40	1.52 \pm 0.06	1.77 \pm 0.68
Intestino grueso	1.16 \pm 0.17	1.45 \pm 0.04	1.28 \pm 0.21
Riñón	13.1 \pm 1.7	13.2 \pm 3.6	13.3 \pm 2.3
Músculo	0.99 \pm 0.18	1.03 \pm 0.42	0.73 \pm 0.30
Hueso	5.80 \pm 1.43	15.5 \pm 1.9	17.1 \pm 4.8
Piel	1.90 \pm 0.45	1.76 \pm 0.22	2.04 \pm 0.99

Ejemplo 4: obtención de imágenes *in vivo* de nanopartículas de HDL radiomarcadas

El presente ejemplo muestra una visualización *in vivo* ejemplificativa de nanopartículas de HDL radiomarcadas utilizando PET/CT.

Obtención de imágenes de PET/CT:

En ratones C57BL/6 (B6) hembra (8 a 10 semanas de edad, $n=4$) portadores de tumores mamarios 4T1 se inyectaron 6.9 ± 0.1 MBq (intervalo de 6.7 a 7.1 MBq) de $^{89}\text{Zr-HDL}$ (180 a 200 μg de ApoA1) en 200 μl de solución de PBS por la vena lateral de la cola. A las 24 h, los animales fueron anestesiados con mezcla de isofluorano

(Baxter Healthcare, Deerfield, IL) gas oxígeno (al 2% para la inducción, al 1% para el mantenimiento) y a continuación se llevó a cabo un escaneo utilizando un escáner de PET/CT Inveon (Siemens Healthcare Global, Erlangen, Alemania). Se llevaron a cabo barridos estáticos de PET de cuerpo completo registrando un mínimo de 50 millones de sucesos coincidentes, con una duración de 15 min. Las ventanas de tiempo de energía y coincidencia fueron de 350 a 700 keV y 6 ns, respectivamente. Se normalizaron los datos de imágenes para corregir la no uniformidad de la respuesta de la PET, pérdidas de recuentos por tiempo muerto, proporción de ramificación de positrones y degradación física hasta el tiempo de inyección, aunque no se aplicó ninguna corrección de atenuación, dispersión o promedio de volúmenes parciales. Las tasas de recuento en las imágenes reconstruidas se convirtieron a concentraciones de actividad (porcentaje de dosis inyectada [%DI] por gramo de tejido) mediante la utilización de un factor de calibración del sistema derivado de la obtención de imágenes de un maniquí de material equivalente a agua del tamaño de un ratón que contenía ⁸⁹Zr. Las imágenes se analizaron utilizando el software ASIPRO VM™ (Concorde Microsystems, Knoxville, TN). La cuantificación de la concentración de actividad se llevó a cabo promediando los valores máximos en por lo menos 5 RDI extraídas de secciones contiguas del tejido de interés. Se llevaron a cabo barridos de CT estándares a baja magnificación de cuerpo completo con la configuración del tubo de rayos X a un voltaje de 80 kV y una corriente de 500 μA. El barrido de CT se adquirió utilizando 120 etapas rotacionales para un total de 220 grados, proporcionando un tiempo de barrido estimado de 120 s con una exposición de 145 ms por cada marco.

Las imágenes de PET corroboraron las observaciones obtenidas en experimentos *in vivo* (figuras 4A y 4B). Las imágenes recogidas a las 24 h mostraron una incorporación hepática, renal y tumoral fuerte con ambas nanopartículas de HDL. Los datos de PET cuantitativos asimismo concordaban con los resultados de biodistribución comentados en el ejemplo 3. Se midieron valores de incorporación tumoral de $18.4 \pm 2.4\%$ DI/g (n=2) y $10.6 \pm 0.6\%$ DI/g (n=2) para ⁸⁹Zr-AI-HDL y ⁸⁹Zr-PL-HDL, respectivamente. La incorporación hepática y renal era más elevada para ⁸⁹Zr-AI-HDL (21.8 ± 4.4 y 19.6 ± 3.8 %DI/g [n=2], respectivamente) que para ⁸⁹Zr-PL-HDL (18.3 ± 3.1 y 11.6 ± 2.7 %DI/g [n=2]). Los valores de incorporación en sangre cuantificados mediante PET, medidos en las cámaras cardíacas, eran significativamente más elevados que los obtenidos de los experimentos *ex vivo*. En este punto temporal, la radioactividad en sangre era $9.1 \pm 1.1\%$ DI/g para ⁸⁹Zr-AI-HDL y de $6.0 \pm 0.1\%$ DI/g para ⁸⁹Zr-PL-HDL. Lo anterior resultó en una señal de fondo incrementada para ⁸⁹Zr-AI-HDL (FIG 4B), así como puntos aislados en la zona intestinal.

Para ⁸⁹Zr-PL-HDL, asimismo se observó incorporación de radioisótopos en el esqueleto y en las articulaciones que concordaba con los resultados *ex vivo*. Cabe destacar que el análisis *ex vivo* de las secciones tumorales permitió la evaluación de las distribuciones espaciales y de tipo celular de las nanopartículas.

Ejemplo 5: análisis histológico *ex vivo* de nanopartículas de HDL radiomarcadas

El presente ejemplo muestra un análisis *ex vivo* ejemplificativo de secciones tumorales para evaluar las distribuciones espaciales y de tipos celulares de las nanopartículas de HDL radiomarcadas. *Tinciones/microscopía:*

Se tiñeron secciones de tejidos (10 μm de grosor, congeladas) para CD31 y anticuerpos anti-CD31 (Dianova, Hamburg, Alemania), seguido de un anticuerpo secundario de cabra anti-rata biotinilado (Vector Labs, Burlingame, CA), estreptavidina-HRP D (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y finalmente, tiramida Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las mismas secciones se tiñeron para Iba1 y anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba1 (Wako, Richmond, VA) seguido de un anticuerpo secundario de cabra anticonejo biotinilado (VECTASTAIN® ABC kit, Vector Labs, Burlingame, CA), estreptavidina-HRP D y tiramida Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para señales fluorescentes (VECTASTAIN® ABC kit, Vector Labs, Burlingame, CA). Se llevó a cabo una tinción nuclear adicional utilizando dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Todas las secciones se contratiñeron con solución de hematoxilina y eosina (H+E). Todas las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia invertida digital automática EVOS FL (Life Technologies, Norwalk, CT). Las imágenes fluorescentes se obtuvieron a una magnificación de 4x, mientras que las imágenes de campo brillante se obtuvieron tanto a una magnificación de 4x como de 20x. En las secciones teñidas, se observó fluorescencia de Iba1 utilizando un cubo de luz de rojo Texas (Ex 585/29, Em 624/40, cubo de luz EVOS LED), mientras que se observó fluorescencia de CD31 utilizando un cubo de luz GFP (Ex 470/22, Em 510/42, cubo de luz EVOS LED).

Autorradiografía:

Tras el sacrificio, se extrajeron tejidos de hígado, bazo, tumor y músculo y se incluyeron en medio de montaje OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), se congelaron sobre hielo seco y se cortó una serie de secciones congeladas de 10 μm de grosor. Para determinar la distribución del radiotrazador, se llevó a cabo una autorradiografía digital introduciendo las secciones de tejido en un casete para película frente a una placa Phosphor de obtención de imágenes (BASMS-2325, Fujifilm, Valhalla, NY) durante 48 h a -20°C. Las placas de imágenes Phosphor se leyeron a una resolución de píxels de 25 μm con un lector de placas Typhoon 7000IP (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). Tras la exposición autorradiográfica, a continuación se utilizaron las mismas secciones congeladas para la tinción inmunohistoquímica y obtención de imágenes.

El análisis histológico de las secciones tumorales recogidas a las 24 h permitió a los presentes inventores

establecer la distribución regional de ambas nanopartículas de HDL (figuras 5A y 5B). Las zonas con elevado depósito de ^{89}Zr están altamente vascularizadas, tal como muestra la colocalización de CD31 y autorradiografía. Sin embargo, la tinción para Iba-1 mostró que particularmente ^{89}Zr -PL-HDL asimismo presentaba un elevado grado de colocalización con las zonas ricas en macrófagos (Figura 5B). Tanto ^{89}Zr -PL-HDL como ^{89}Zr -AI-HDL podrían haberse acumulado en zonas ricas en macrófagos, tal como pone de manifiesto la colocalización de la radioactividad con las zonas positivas para Iba-1 (figuras 5A y 5B).

Ejemplo 6: distribución celular de nanopartículas de HDL radiomarcadas

El presente ejemplo muestra el análisis ejemplificativo de citometría de flujo de un panel completo de biomarcadores para diferenciar la especificidad celular de las nanopartículas de HDL radiomarcadas para siete tipos celulares diferentes.

Citometría de flujo:

Ratones C57BL/6 (B6) hembra fueron inoculados por vía subcutánea con células de cáncer mamario murino (4T1) (1×10^6 células) en los flancos. El día 9 después de la implantación, se extrajeron los tumores, se cortaron en cubos y se digirieron con un cóctel de enzimas, incluyendo liberasa TH (Roche), hialuronidasa (Sigma-Aldrich) y ADNasa (Sigma-Aldrich) en un horno a 37°C durante una hora. Se prepararon suspensiones de células individuales mediante eliminación de los agregados de tejidos, matriz extracelular y residuos celulares de la solución. Se aplicó la misma configuración de citometría de flujo a todas las muestras. Se detectó DiO en el canal de FITC. Todas las muestras fueron medidas en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Los resultados se analizaron con FlowJo (Ashland, OR) y se calcularon las estadísticas con Prism (GraphPad, La Jolla, CA). Los anticuerpos y clones utilizados se presentan en la tabla 4, a continuación, y el procedimiento de selección se muestra en la figura 7.

Tabla 4

Anticuerpo	Clon	Proveedor
Ly6C	HK1.4	eBioscience
MHCII (I-A/I-E)	M5/114.152	eBioscience
CD45	30-F11	Biolegend
CD64,	X54-5/7.1	Biolegend
CD11b	M1/70	eBioscience
CD3	17A2	Biolegend
CD31	13.3	BD Biosciences
CD11c	M418	eBioscience

Se determinó la distribución intercelular de las sondas de HDL marcadas con ^{89}Zr mediante citometría de flujo con un análogo no radioactivo marcado con una etiqueta fluorescente (DiO). Mediante cromatografía de exclusión por tamaño, la nanopartícula marcada DiO@HDL presentaba el mismo tiempo de retención que su contrapartida sola, no marcada, y que los de ^{89}Zr -AI-HDL y ^{89}Zr -PL-HDL.

Se utilizó un procedimiento de selección de citometría de flujo para identificar los niveles de HDL en 7 tipos celulares relevantes, incluyendo los TAM, células derivadas de monocitos, monocitos, células dendríticas (CD), células T, células endoteliales (CE) y células tumorales (figuras 6A a 6C). Las variaciones en las intensidades de fluorescencia entre los diferentes tipos celulares podrían reflejar cómo las nanopartículas de HDL interactúan con sus dianas. La incorporación de HDL más elevada fue por los TAM, siendo 3.5 veces más elevada que por células derivadas de monocitos ($P < 0.05$), 28.8 veces más elevada que por monocitos ($P < 0.05$), 4.1 veces más elevada que por células dendríticas ($P < 0.05$), 126 veces más elevada que por células T ($P < 0.05$), 8.2 veces más elevada que por células endoteliales ($P < 0.05$) y 7.2 veces más elevada que por células tumorales ($P < 0.05$). En dicho modelo tumoral, los TAM constituían $13.6 \pm 1.7\%$ de las células vivas y la HDL unida a TAM formaba $58.6 \pm 17.5\%$ de la HDL intracelular total en todas las células vivas. El nivel elevado de HDL en los TAM fue el contribuyente principal a la incorporación de HDL 1.6 veces más elevada en células inmunitarias CD45^+ que en células no inmunitarias CD45^- ($P < 0.05$). Estos datos muestran claramente que HDL no sólo se acumula eficientemente en los tumores, sino que asimismo presenta como diana específica los TAM.

De manera similar al análisis histológico en el ejemplo 5, HDL preferentemente se dirigía a células inmunitarias, particularmente macrófagos, seguido de células derivadas de monocitos y células dendríticas. Los monocitos, células T, células endoteliales y células tumorales sólo marginalmente eran dianas (figura 6C). Estos resultados, junto con los observados en el análisis histológico, indican que las nanopartículas de HDL presentan como diana los macrófagos con elevada especificidad, concordando con su función biológica.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal, comprendiendo la nanopartícula apolipoproteína 1 (ApoA1) y uno o más fosfolípidos, en la que la nanopartícula es radiomarcada con un radioisótopo mediante la incorporación de una ApoA1 modificada con quelante con el radioisótopo; y opcionalmente la incorporación de un fosfolípido modificado con quelante con el radioisótopo.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la nanopartícula es radiomarcada con el radioisótopo mediante ApoA1 modificada con quelante y en la que la nanopartícula comprende el fosfolípido modificado con quelante.
3. Composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la nanopartícula presenta un peso molecular dentro de un intervalo de 100 kDa a 400 kDa como se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal presenta un diámetro medio dentro de un intervalo de 5 nm a 30 nm como se mide mediante DLS en agua o solución salina tamponada con fosfato (PBS).
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los uno o más fosfolípidos comprenden uno o más elementos seleccionados de entre el grupo que consiste en dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dipentadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diheptadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (MHPC), 1-pentadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (PHPC), 1-heptadecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, 1-estearoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (SHPC), 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (OHPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y 1,2-dipalmitoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fosfolípido modificado con quelante comprende 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE).
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que algunos de los uno o más fosfolípidos en la nanopartícula son sustituidos eficazmente por el fosfolípido modificado con quelante.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende un portador.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el quelante es un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en deferoxamina B (DFO), ácido 1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecán-4,11-diil)diacético (CB-TE2A); ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA); ácido 1,4,7,10-tetraazaciclodecán-1,4,7,10-tetraacético (DOTA); ácido etilendiamintetraacético (EDTA); ácido etilén glicolbis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA); ácido 1,4,8,11-tetraazaciclodecán-1,4,8,11-tetraacético (TETA); etilénbis-(2-4 hidroxifenilglicina) (EHPG); 5-CI-EHPG; 5Br-EHPG; 5-Me-EHPG; 5t-Bu-EHPG; 5-sec-Bu-EHPG; ácido benzodietilentriamin pentaacético (benzo-DTPA); dibenzo-DTPA; fenil-DTPA, difenil-DTPA; bencil-DTPA; dibencil-DTPA; ácido bis-2 (hidroxibencil)-etilén-diamindiacético (HBED) y derivados de los mismos; Ac-DOTA; benzo-DOTA; dibenzo-DOTA; ácido 1,4,7-triazaciclodecán N,N,N"-triacético (NOTA); benzo-NOTA; benzo-TETA, ligandos de hidroxipiridinonato octadentados (HOPO), benzo-DOTMA, en el que DOTMA es 1,4,7,10-tetraazaciclodecán-1,4,7,10-tetra(ácido metil tetraacético), benzo-TETMA en la que TETMA es 1,4,8,11-tetraazaciclodecán-1,4,8,11-(ácido metil tetraacético); derivados de ácido 1,3-propilendiaminatetraacético (PDTA); ácido trielentetraaminhexaacético (TTHA); derivados de 1,5,10-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)-tricatecolato (LICAM); y 1,3,5-N,N',N"-tris(2,3-dihidroxibenzoil)aminometilbenceno (MECAM).
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el quelante comprende deferoxamina B (DFO).
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el radioisótopo comprende un miembro seleccionado de entre el grupo que consiste en ^{89}Zr , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{66}Ho , ^{177}Lu , ^{149}Pm , ^{90}Y , ^{212}Bi , ^{103}Pd , ^{109}Pd , ^{159}Gd , ^{140}La , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{67}Cu , ^{105}Rh , ^{111}Ag y ^{192}Ir .
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el radioisótopo comprende ^{89}Zr .
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la utilización en un método de obtención de imágenes de macrófagos asociados a tumor (TAM) mediante tomografía de emisión de positrones de lipoproteína de alta densidad (HDL PET), comprendiendo el método:

administrar a un sujeto la composición para permitir que la nanopartícula se acumule en una zona de TAM; y
detectar el radioisótopo mediante PET tras la acumulación de la nanopartícula en la zona de TAM.

5 14. Método de preparación de la nanopartícula de lipoproteína de alta densidad discoidal según la reivindicación
1, comprendiendo el método uno o más de (i), (ii), (iii) y (iv):

10 (i) modificar ApoA1 con un quelante, hacer reaccionar la ApoA1 modificada con un radioisótopo que
comprende una fracción oxalato, e incorporar la ApoA1 modificada con quelante radiomarcada en la
nanopartícula;

(ii) modificar ApoA1 con un quelante, incorporar la ApoA1 modificada con quelante en la nanopartícula, y hacer
reaccionar la ApoA1 modificada con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato;

15 (iii) modificar DSPE con un quelante, hacer reaccionar la DSPE modificada con un radioisótopo que comprende
una fracción oxalato, e incorporar DSPE modificada con quelante radiomarcada en la nanopartícula; y

20 (iv) modificar DSPE con un quelante, incorporar la DSPE modificada con quelante en la nanopartícula, y hacer
reaccionar la DSPE modificada con quelante con un radioisótopo que comprende una fracción oxalato.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la utilización en un método de evaluación
del pronóstico y el resultado terapéutico de diferentes etapas de una enfermedad en un sujeto.

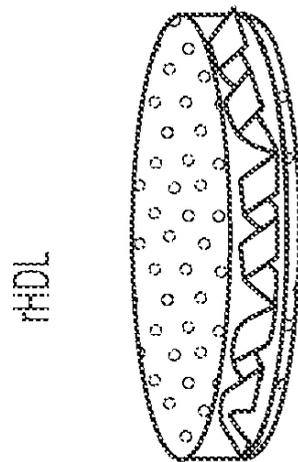
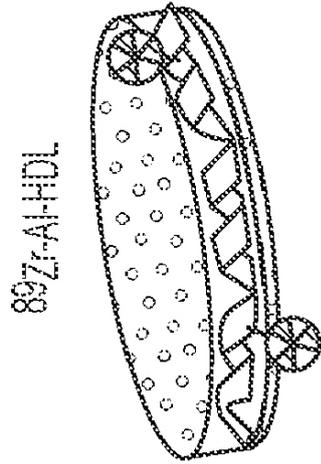
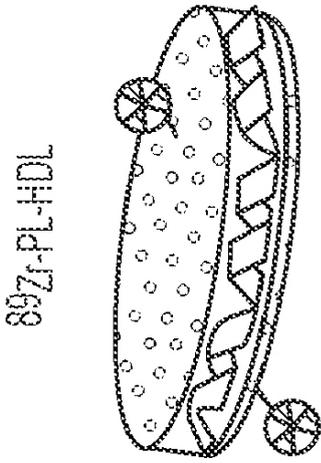


FIG. 1A

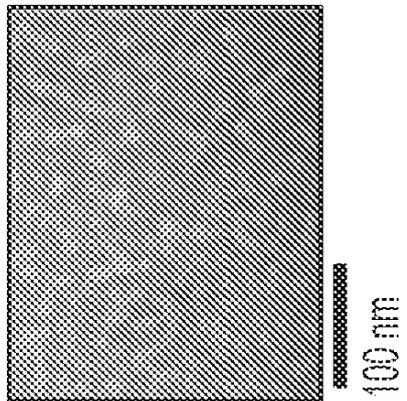
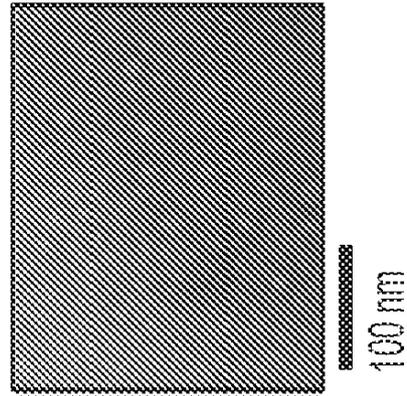
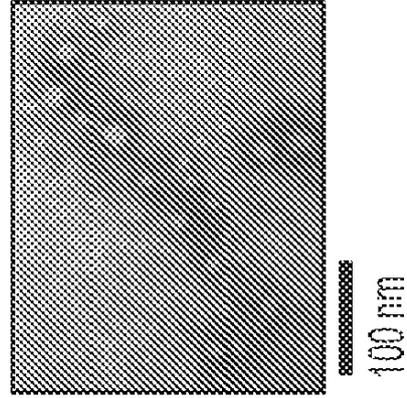


FIG. 1B

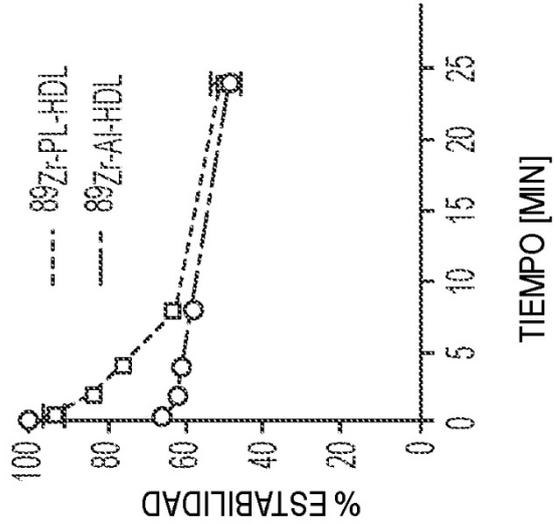


FIG. 2C

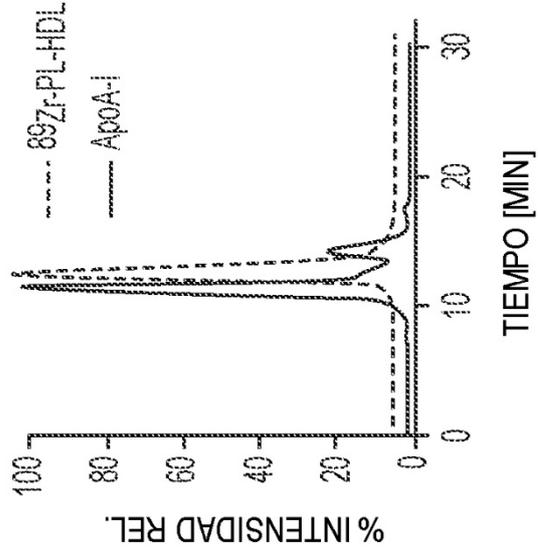


FIG. 2B

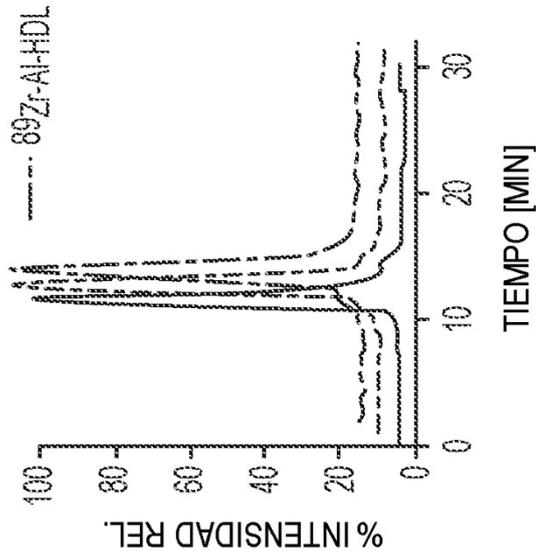
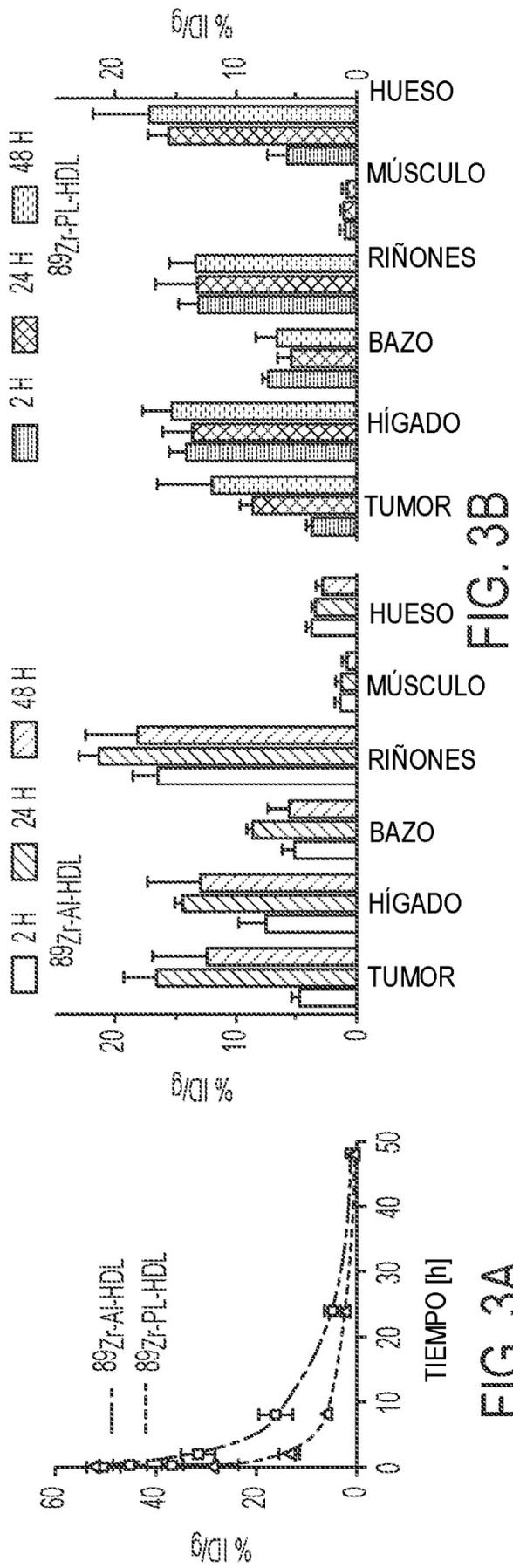


FIG. 2A



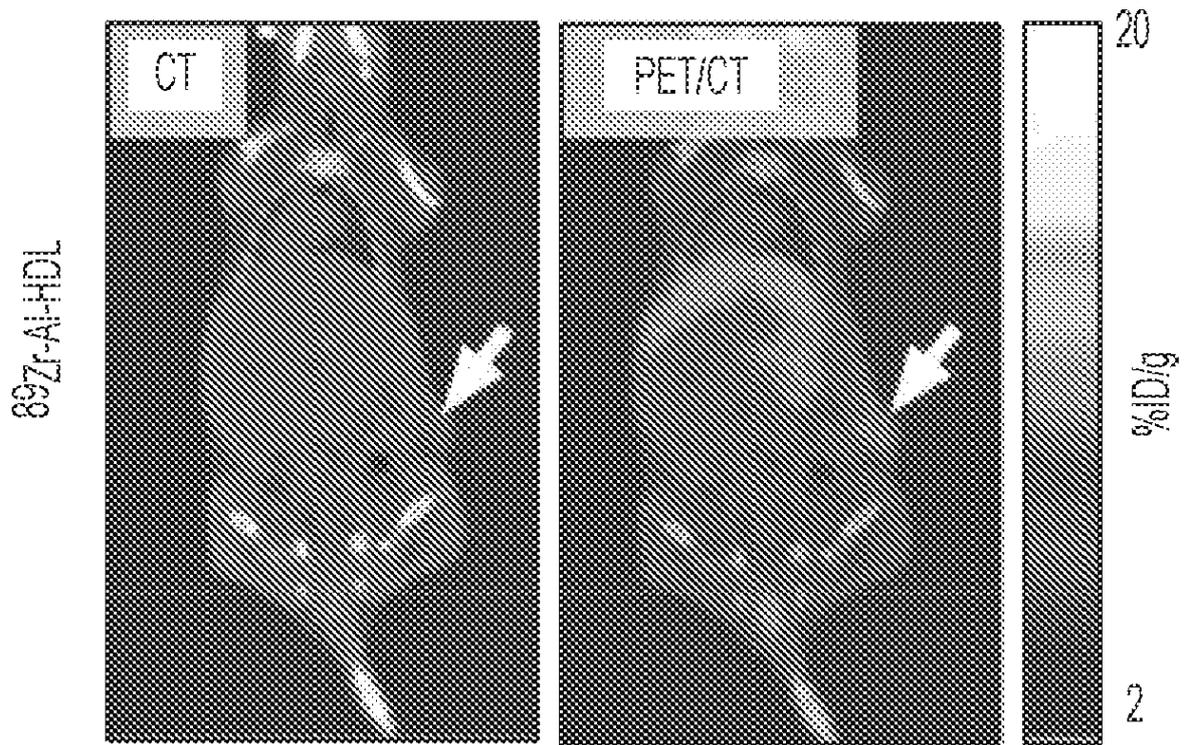


FIG. 4A

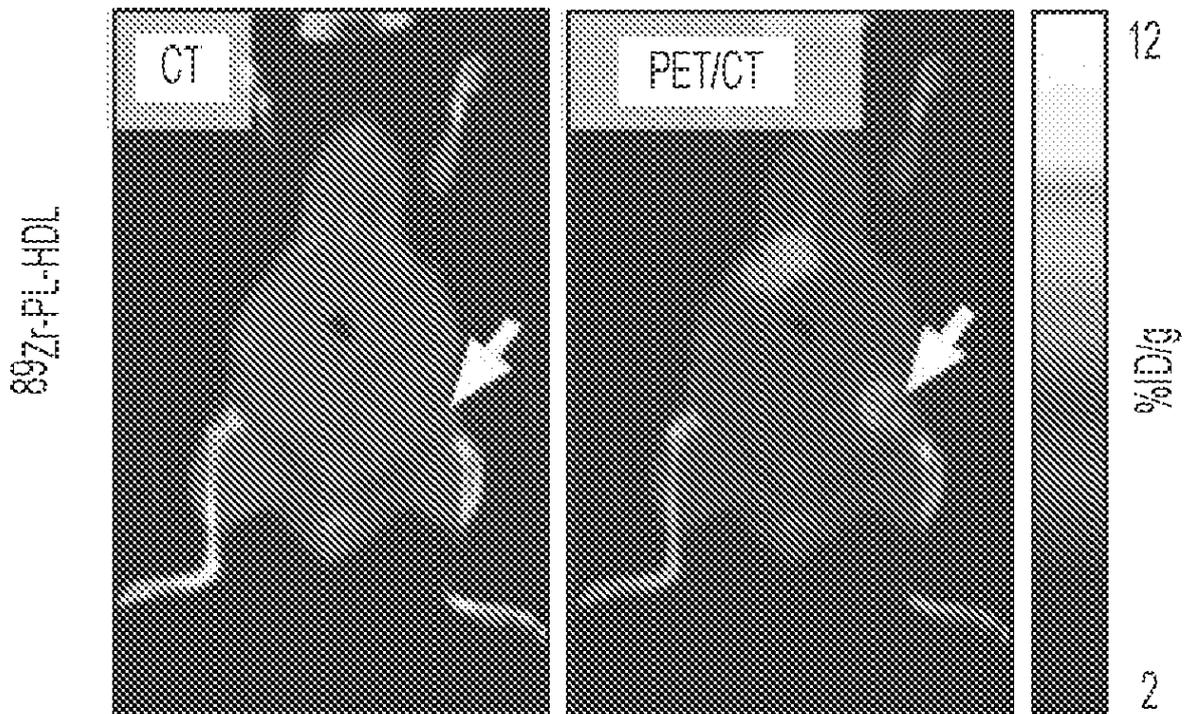


FIG. 4B

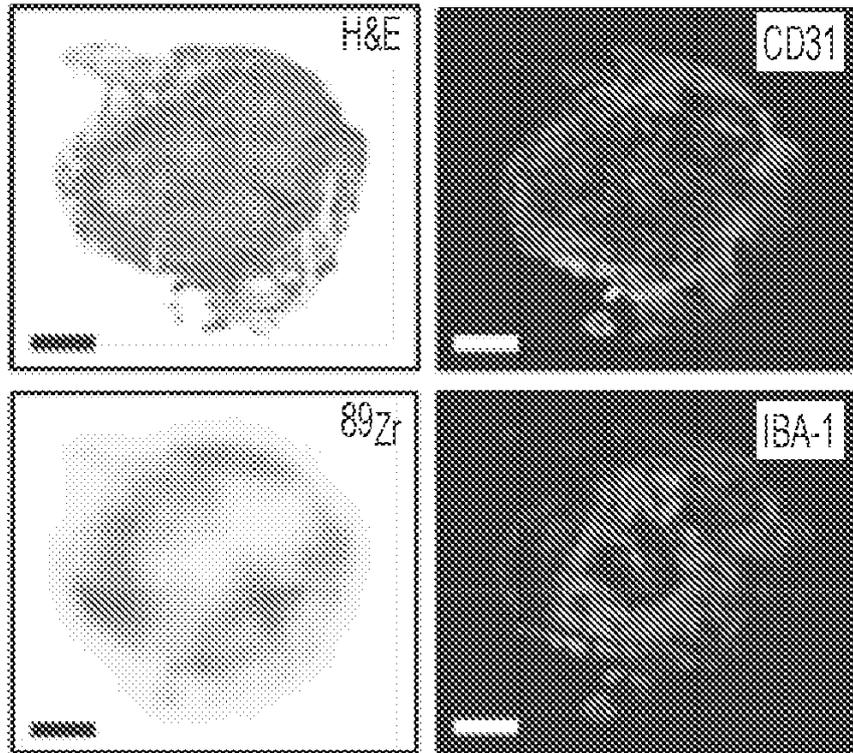


FIG. 5A

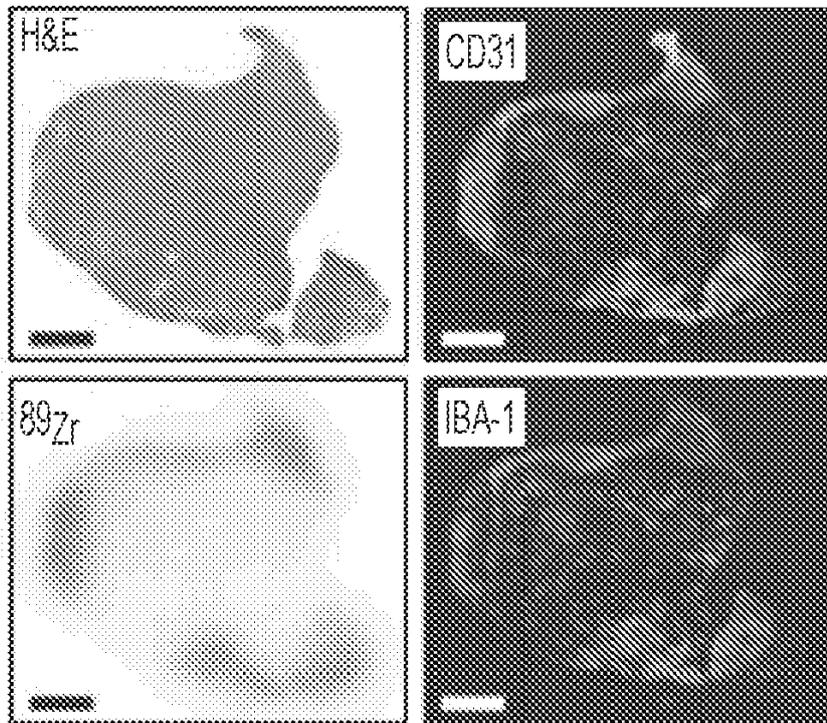


FIG. 5B

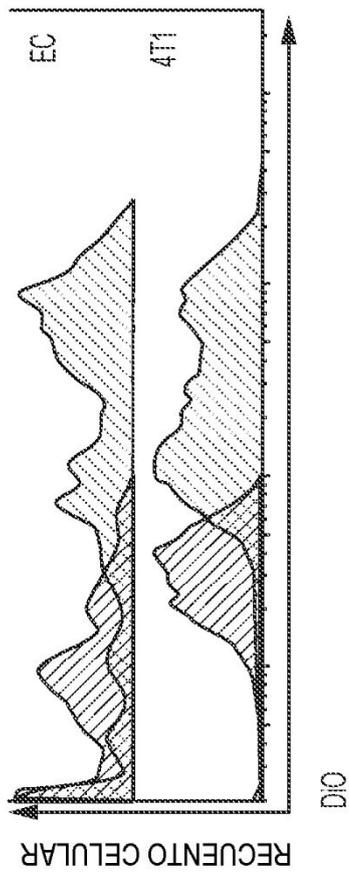


FIG. 6B

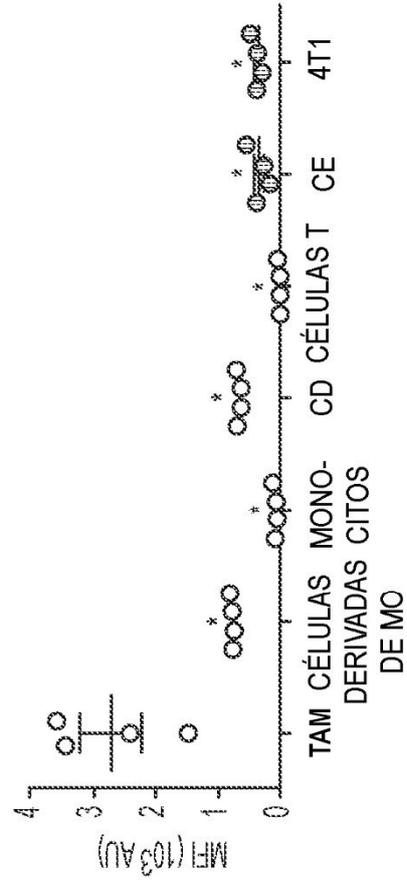


FIG. 6C

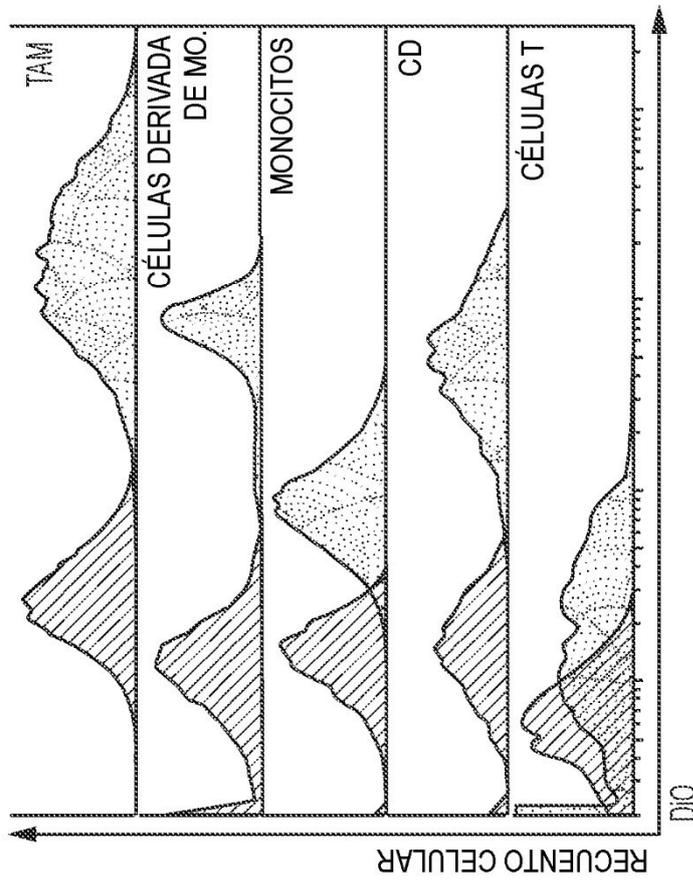


FIG. 6A

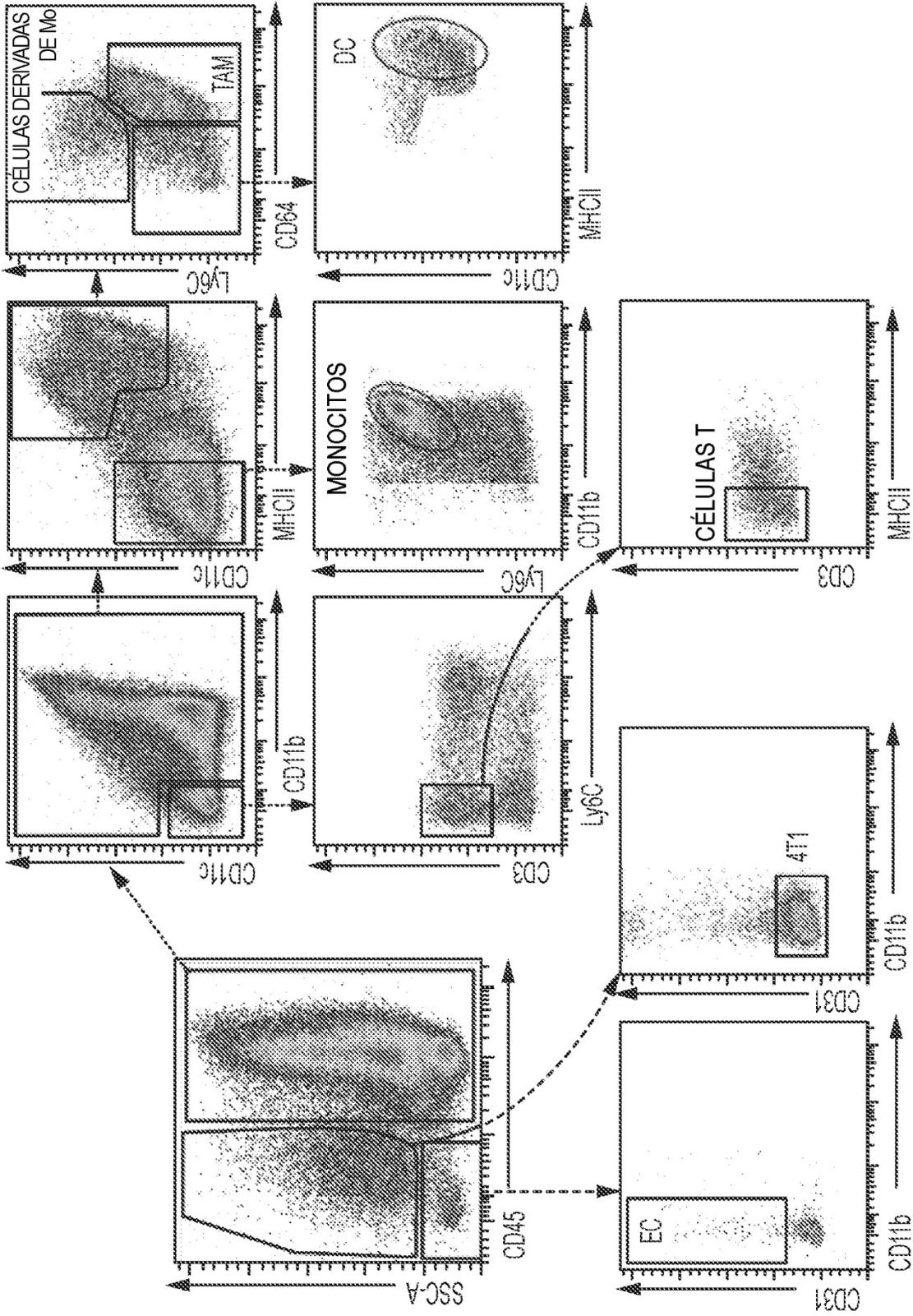


FIG. 7