

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 620**

51 Int. Cl.:

A61K 38/40	(2006.01)
A61K 47/64	(2007.01)
A61K 47/69	(2007.01)
A61K 51/12	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
A61K 35/15	(2015.01)
C12N 5/0786	(2010.01)
A61K 38/42	(2006.01)
A61K 35/17	(2015.01)
C12N 5/0787	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2016 PCT/EP2016/064483**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16207256**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2016 E 16733390 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3310905**

54 Título: **Sistema de suministro de marcadores objetivo celulares**

30 Prioridad:

22.06.2015 PL 41278715

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

30.10.2024

73 Titular/es:

**CELLIS AG (100.0%)
Bleicherweg 45
8002 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**KRÓL, MAGDALENA;
BENNI, IRENE;
BAIOCCO, PAOLA;
RYGIEL, TOMASZ y
BOFFI, ALBERTO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 620 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

Sistema de suministro de marcadores objetivo celulares

La presente invención se refiere a un sistema de suministro con objetivo celular aislado que comprende una célula de leucocitos CD45⁺ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y/o un marcador, así como métodos para producir dicho sistema de suministro con objetivo celular aislado y usos de dicho sistema para diagnóstico y en particular para diagnóstico de cáncer, particularmente cáncer metastásico.

Antecedentes de la invención

Las herramientas de imagen actuales son capaces de detectar metástasis grandes (de más de 0.5 a 1 cm de tamaño). Sin embargo, rara vez detectan la diseminación temprana de células tumorales metastásicas. Las metástasis humanas de menos de 0.5 cm son avasculares, por lo que carecen de un suministro adecuado de sangre y oxígeno. Significa que no es posible administrar agentes de contraste a través de la circulación sanguínea con el fin de marcar estas metástasis y obtener imágenes de ellas. La presencia de hipoxia es una característica común de las micrometástasis donde la fracción hipóxica puede llegar al 90 % con poca o ninguna perfusión sanguínea (Li, et al. 2012, Journal of Solid Tumours, 2(2): 28-33). Por lo tanto, la hipoxia severa se considera una característica general de las micrometástasis.

El objetivo de una o más micrometástasis escondidas dentro de una gran población de células normales presenta un desafío único, ya que el acceso a las micrometástasis se ve impedido por varias barreras biológicas y un suministro de sangre deficiente; además, el pequeño tamaño de las micrometástasis y su dispersión presentan otros obstáculos a los órganos.

Por la misma razón, las micrometástasis suelen ser refractarias a la terapia. Si bien los tumores sólidos a partir de los cuales se originaron las micrometástasis a menudo responden bien a la terapia convencional, a menudo hay un nuevo crecimiento en el sitio del tumor primario o en los sitios de metástasis. Esto constituye un problema grave en oncología clínica (Muthana, et al. 2012, Cancer Res; 73(2); 490-495). Este está relacionado con las características del microambiente de los tumores sólidos que limitan la penetración de los fármacos, exponiendo así el tumor a concentraciones de fármacos inferiores a las eficaces (Hobbs, et al. 1998, Proc Natl Acad Sci EE.UU.: 4607-4612). Esto es causado por una vasculatura inadecuada que resulta en: alta heterogeneidad de las células cancerosas, baja tensión de oxígeno (hipoxia), bajo pH y baja concentración de glucosa dentro de la masa (Kizaka-Kondoh, et al., 2003, Cancer Sci 94(12): 1021-1028). Además, la rápida proliferación de células tumorales en algunas áreas podría superar la tasa de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, promoviendo la formación de áreas hipóxicas (Lewis and Murdoch, 2005, Am J Pathol 167(3):627-635). Esta arquitectura anormal de los vasos y, posteriormente, su función deteriorada que resulta en hipoxia tumoral se asocia con un fenotipo más maligno y una supervivencia deficiente en pacientes que padecen tumores sólidos y resulta tanto en el fracaso del tratamiento debido a la disminución de la absorción de fármacos como en los cambios inducibles por la hipoxia en las células cancerosas (Sun, et al., 2012, Clin Cancer Res 18(3):758-770; Sullivan, et al., 2008 Mol Cancer Ther 7(7): 1961-1973; Kizaka-Kondoh, et al., 2003, Cancer Sci 94(12): 1021-1028). Además, la quimioterapia o la radioterapia provocan la formación adicional de grandes áreas de hipoxia tumoral, lo que dificulta aún más el tratamiento del tumor. El hecho de que la eficacia de la terapia contra el cáncer esté limitada por la presencia de células tumorales hipóxicas ha dado lugar a la introducción de una variedad de enfoques terapéuticos destinados a superar este problema.

Choi et al. (Biomaterials 33(16):4195-4203) divulga el marcaje de macrófagos con óxido de hierro que puede atacar específicamente tumores in vivo y permitir la obtención de imágenes. Tracy et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1820(3):291-317) divulga el uso de ferritina cargada con óxido de hierro acoplada a un anticuerpo dirigido a Necl-5 para visualizar tumores in vivo.

Los presentes inventores han encontrado que las células de leucocitos CD45⁺, en particular los macrófagos activados, pueden captar uno o más marcadores complejos o no con una o más proteínas fijadoras de hierro *in vitro* y administrar estos complejos a o dentro de las células, preferiblemente a o dentro de células tumorales *in vivo*. Basándose en esta observación, los presentes inventores han superado uno o más de los problemas de la técnica anterior mencionados anteriormente. Por lo tanto, el sistema de suministro con objetivo de la presente invención proporciona *Entre otras* una o más de las siguientes ventajas: (i) entrega específica de uno o más marcadores a tejidos que atraen los leucocitos CD45⁺ mencionado anteriormente, preferiblemente en células enfermas, (ii) protección de marcadores contra la inactivación en la circulación sanguínea o eliminación del cuerpo, (iii) administración de marcadores, preferiblemente en células de áreas de enfermedad pobremente o no vascularizadas, por ejemplo, metástasis, áreas hipóxicas dentro de tumores más grandes, lesiones reumáticas, heridas avasculares, piel, (iv) toxicidad reducida de los marcadores, (v) administración de marcadores con farmacocinética deficiente, (vi) efectos secundarios reducidos de los marcadores debido a su suministro objetivo, (vii) mayor eficacia diagnóstica con dosis más bajas de los marcadores debido al suministro objetivo; (viii) menor riesgo de lesión tisular local en el sitio de administración del marcador debido a la administración del marcador vinculada con la proteína fijadora de hierro, que se carga dentro de los leucocito CD45⁺; y/o (ix) posibilidad de detectar pequeñas metástasis altamente hipóxicas (Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. 2015, Eur J Pharm Biopharm 93:52-79).

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un sistema de suministro con objetivo aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipiente(s) adecuado(s), en donde el sistema de suministro con objetivo aislado comprende una célula de leucocitos CD45+ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, en donde el marcador (i) se selecciona entre un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido detectable y un agente de contraste, o (ii) comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes; y en donde en el complejo (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos de forma covalente y/o no covalente, o (ii) el marcador está atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o enlace no covalente.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de suministro con objetivo aislado que comprende una célula de leucocitos CD45+ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, para uso en un método de diagnóstico *in vivo*; donde en el complejo: (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos de forma covalente y/o no covalente, o (ii) el marcador está atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o no covalente.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Antes de que la presente invención se describa en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las realizaciones preferidas no deben interpretarse como que limitan la presente invención sólo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción respalda y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación. Cada uno de los documentos citados en este documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sean *supra* o *infra*, se incorporan al presente como referencia en su totalidad. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a ser anterior a dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

Definiciones

Para practicar la presente invención, a menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de química, bioquímica y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (compárese., por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un entero o etapa o grupo de enteros indicados o etapas pero sin la exclusión de cualquier otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas. Tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes en plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

La expresión "suministro de marcador objetivo" o "suministro de agente de contraste objetivo" se refiere a la administración de un marcador, en particular un agente de contraste a un paciente o una persona a diagnosticar, lo que da como resultado una mayor concentración del marcador, en particular el agente de contraste en una región particular del cuerpo en comparación con otras regiones del cuerpo de ese paciente. Preferiblemente, las concentraciones relativas se comparan entre la(s) región(es) enferma(s) del cuerpo y otras regiones del cuerpo que tienen acceso similar a la circulación sanguínea. En realizaciones preferidas, la concentración del marcador, en particular un agente de contraste en un número dado de células o un volumen de biopsia dado de la región enferma es al menos un 10 % mayor, en comparación con el número idéntico de células o volumen de biopsia de una región no enferma después del suministro del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, preferiblemente después de 1-24 horas. Más preferiblemente, la concentración del marcador, en particular del agente de contraste en

la región enferma del cuerpo de un paciente es al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 100 %, al menos el 150 %, al menos el 200 %, al menos el 250 %, al menos el 300 %, al menos el 350 %, al menos el 400 %, al menos un 450 %, al menos un 500 %, más preferiblemente al menos un 1000 % mayor que en una región no enferma del cuerpo después de la administración del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, preferiblemente después de 2 a 24 horas. Cuando se evalúa sobre la base de la distribución corporal total, se prefiere que al menos el 5 % del marcador, en particular el agente de contraste administrado a un paciente o a una persona a diagnosticar, se suministre en la región enferma del cuerpo, preferiblemente al menos el 10 %, más preferiblemente al menos 15 %. El suministro objetivo del marcador, en particular del agente de contraste, limita los efectos nocivos potenciales de un marcador, en particular del agente de contraste, en la región enferma del cuerpo.

Los términos "sistema de suministro de marcador objetivo" o "sistema de suministro con objetivo" se usan como sinónimos en la presente solicitud y se refieren a un sistema que es capaz de administrar un marcador, en particular un agente de contraste a la región objetivo, es decir, capaz de administrar un marcador objetivo, preferiblemente dentro del cuerpo de un paciente.

El término "marcador", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a cualquier tipo de compuesto que sea adecuado para fines de diagnóstico. Los compuestos preferidos se seleccionan entre un tinte fluorescente, un radioisótopo y un agente de contraste. Un agente de contraste es un tinte u otra sustancia que ayuda a mostrar áreas anormales dentro del cuerpo. En una realización, el término marcador se refiere a un compuesto que comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes. Los radioisótopos/isótopos emisores de fluorescencia preferidos se seleccionan del grupo que consiste en isótopos emisores de radiación alfa, isótopos emisores de radiación gamma, isótopos emisores de electrones Auger, isótopos emisores de rayos X, isótopos fluorescentes, tales como ⁶⁵Tb, isótopos emisores de fluorescencia, como ¹⁸F, ⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁸⁸Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ¹⁴⁹Pm, ¹⁷⁷Lu, ⁴⁷Sc, ¹⁴²Pr, ¹⁵⁹Gd, ²¹²Bi, ⁷²As, ⁷⁷Se, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ^{101m15}Rh, ¹¹⁹Sb, ¹²⁸Ba, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ¹⁹⁷Hg, ²¹¹At, ¹⁶⁹Eu, ²⁰³Pb, ²¹²Pb, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁹⁸Au y ¹⁹⁹Ag así como conjugados y combinaciones de los anteriores con proteínas, péptidos, inhibidores moleculares pequeños, anticuerpos u otros compuestos, por ejemplo, ¹⁸F fluorodesoxiglucosa (¹⁸F-FDG) o ⁶⁴Cu-porfirina. Los tintes fluorescentes preferidos se seleccionan entre las siguientes clases de tintes: Xantenas (por ejemplo, fluoresceína), acridinas (por ejemplo, amarillo de acridina), oxazinas (por ejemplo, oxazina 1), cininas (por ejemplo, Cy7/Cy 3), tintes de estirilo (por ejemplo, Dye-28), cumarinas (por ejemplo, Alexa Fluor 350), porfinas (por ejemplo, clorofila B), complejos de metal-ligando (por ejemplo, PtOEPK), proteínas fluorescentes (por ejemplo, APC, R-ficoeritrina), nanocristales (por ejemplo, QuantumDot 705), perilenos (por ejemplo, Lumogen Red F300) y ftalocianinas (por ejemplo, IRDYE™700DX), así como conjugados y combinaciones de estas clases de tintes o ⁶⁵Tb fluorescentes emisor. Los agentes de contraste preferidos se seleccionan entre agentes paramagnéticos, por ejemplo, Gd, Eu, W y Mn, preferiblemente complejados con un agente quelante. Otras opciones son los complejos y partículas superparamagnéticos de hierro (Fe), compuestos que contienen átomos de alto número atómico, es decir, yodo para tomografía computarizada (CT), microburbujas y vehículos como los liposomas que contienen estos agentes de contraste.

El término "péptido" o "polipéptido" se usa indistintamente en el contexto de la presente invención para referirse a una cadena de al menos dos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Así, el término "péptido" en el contexto de la presente invención también se utiliza para referirse a cadenas de aminoácidos con más de 50, más de 100 o más de 150 aminoácidos.

El término "identidad de secuencia" se utiliza en toda la especificación con respecto a comparaciones de secuencias de polipéptidos y nucleótidos. En caso de que se comparen dos secuencias y no se especifique la secuencia de referencia en comparación con la cual se debe calcular el porcentaje de identidad de secuencia, la identidad de secuencia se calculará con referencia a la más larga de las dos secuencias a comparar, si no se indica específicamente lo contrario. Si se indica la secuencia de referencia, la identidad de la secuencia se determina en base a la longitud total de la secuencia de referencia indicada por SEQ ID, si no se indica específicamente lo contrario. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica que consiste en 200 aminoácidos en comparación con una secuencia polipeptídica de referencia de 300 aminoácidos de longitud puede presentar un porcentaje máximo de identidad de secuencia del 66.6 % (200/300), mientras que una secuencia con una longitud de 150 aminoácidos puede presentar un porcentaje máximo de identidad de secuencia del 50 % (150/300). Si 15 de esos 150 aminoácidos son diferentes de los respectivos aminoácidos de la secuencia de referencia de 300 aminoácidos de longitud, el nivel de identidad de secuencia disminuye al 45 %. La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar mediante alineamientos de secuencias. Tales alineamientos se pueden llevar a cabo con varios algoritmos conocidos en la técnica, preferiblemente con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Csi. USA 90: 5873-5877), con hmalign (HMMER package, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, JD, Higgins, DG y Gibson, TJ (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> o en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> o en http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html. Los parámetros preferidos utilizados son los parámetros predeterminados tal como se configuran en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> o <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. El grado de identidad de secuencia (coincidencia de secuencia) se puede calcular usando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan

con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3. Para obtener alineaciones con espacios con fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros predeterminados de los respectivos programas. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., *Bioinformática* 2003b, 19 Suppl 1:154-162) o campos aleatorios de Markov. También se pueden usar alineamientos basados en estructuras para múltiples secuencias y/o estructuras de proteínas utilizando información de búsquedas en bases de datos de secuencias, homólogos disponibles con estructuras 3D y restricciones definidas por el usuario (Pei J, Grishin NV: PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics* 2007, 23:802-808; 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into a multiple sequence alignment. Poirot O, Suhre K, Abergel C, O'Toole E, Notredame C. *Nucleic Acids Res.* 2004 jul 1;32W37-40.). Cuando en la presente solicitud se hace referencia a porcentajes de identidad de secuencia, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, si no se indica específicamente lo contrario.

El término "leucocito" se utiliza en el contexto de la presente invención para referirse a células del sistema inmunológico que participan en la protección del cuerpo tanto contra enfermedades infecciosas como contra invasores extraños. Todos los leucocitos se producen y derivan de células multipotentes de la médula ósea conocidas como células madre hematopoyéticas. Los leucocitos se encuentran en todo el cuerpo, incluidos la sangre y el sistema linfático. Todos los leucocitos tienen núcleo, lo que los distingue de otras células sanguíneas, los glóbulos rojos anucleados (RBC) y las plaquetas. Los tipos de leucocitos se pueden clasificar de forma estándar. Dos pares de las categorías más amplias los clasifican por estructura (granulocitos o agranulocitos) o por linaje de división celular (células mieloides o células linfoides). Estas categorías más amplias se pueden dividir en cinco tipos principales: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Estos tipos se distinguen por sus características físicas y funcionales. Los monocitos y los neutrófilos son fagocíticos. Se pueden clasificar más subtipos; por ejemplo, entre los linfocitos hay células B, células T y células NK. Los granulocitos se distinguen de los agranulocitos por la forma de su núcleo (lobulado versus redondo, es decir, polimorfonuclear versus mononuclear) y por sus gránulos de citoplasma (presentes o ausentes, o más precisamente, visibles al microscopio óptico o no visibles). La otra dicotomía es por linaje: Las células mieloides (neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) se distinguen de las células linfoides (linfocitos) por el linaje hematopoyético (linaje de diferenciación celular).

Los presentes inventores han observado que la expresión CD45⁺ es característica de células de leucocitos que son adecuadas para usarse en el contexto del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, en particular desde que las células de leucocitos CD45⁺ son atraídas por tejidos y células particulares dentro del cuerpo y son capaces de suministrar complejos de una o más proteínas fijadoras de hierro y uno o más marcadores, en particular los agentes de contraste, hacia o dentro de las células. El experto entiende que las células de leucocitos CD45⁺, a menos que sean de origen clonal, son una población mixta de diferentes leucocitos que comparten la propiedad común de expresar antígeno de superficie CD45⁺. En consecuencia, subpoblaciones de células dentro del grupo diverso de los leucocitos CD45⁺ se caracterizan en toda la memoria por otras características funcionales y/o estructurales. El término "CD45⁺" indica que la mayoría de las células dentro de una población de células o esencialmente todas las células expresan el antígeno de superficie CD45⁺. En este contexto y también con referencia a otros antígenos de superficie celular, el término "expresa" indica que el antígeno de superficie se produce dentro de la célula y se expone de manera detectable en la superficie de una célula. El nivel de expresión y, por lo tanto, el número de antígenos de superficie detectablemente expuestos en la superficie de una célula pueden variar mucho entre diferentes leucocitos. Generalmente, una célula se considera positiva, es decir, se indica que es "+", para un antígeno de superficie celular, si al menos 5, preferiblemente al menos 10 copias del antígeno de superficie están expuestas de manera detectable en la superficie de la célula. El experto sabe muy bien cómo detectar, cuantificar y seleccionar células que son positivas (o negativas) para un antígeno de superficie celular determinado. Los métodos preferidos incluyen la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En esta tecnología, se utilizan anticuerpos marcados con fluorescencia para unirse a antígenos de la superficie celular de una población de células; posteriormente, las células se aíslan en células individuales y, en función de la intensidad de fluorescencia medida para cada célula individual, se caracterizan como positivas o negativas para el antígeno de superficie celular dada. En algunas realizaciones de la presente invención se indica que la expresión de una proteína determinada es alta o baja. Esto significa que la proteína se expresa de manera detectable en ambos casos, es decir, es "+", sin embargo, en diferentes niveles. La expresión alta y baja, respectivamente, significará diferentes números absolutos de proteínas por célula para diferentes proteínas. Por lo tanto, se puede considerar que una proteína determinada se expresa en niveles altos si hay más de 500 copias detectables de esa proteína por célula y que se expresa en niveles bajos si hay entre 1 y 50 copias detectables de esa proteína por célula. Sin embargo, se puede considerar que otra proteína se expresa en niveles altos, si hay más de 5000 copias detectables y se expresa en niveles bajos, si hay entre 1 y 500 copias detectables por célula. Es bien conocido en la técnica cómo cuantificar el número de proteínas expresadas o producidas en una célula usando citometría de flujo y un método de cuentas Becton Dickinson Quantibrite™ (ver, por ejemplo, Pannu, KK, 2001, *Cytometry*. 2001 Dec 1; 45 (4): 250-8) o espectrometría de masas (ver, por ejemplo Milo, R., 2013, *Bioessays*, 35(12): 1050-1055). Para los fines de la presente invención, el término "alta expresión" de una proteína determinada se refiere a la expresión detectable de esa proteína que es al menos el 70 % del nivel de expresión más alto encontrado, es decir, el número de copias por célula, en una población de leucocitos CD45⁺ sanos. El término "baja expresión" de una proteína determinada se refiere a la expresión detectable de esa proteína que es el 30 % o menos del nivel de expresión más alto encontrado, es decir, el número de copias de esa proteína por célula, en una población de

leucocitos CD45⁺ sanos. Preferiblemente, el “nivel de expresión más alto” se determina como el promedio de los niveles de expresión más altos encontrados en leucocitos CD45⁺ sanos de diferentes sujetos. En algunas realizaciones, las subpoblaciones preferidas de células se caracterizan por “producir” una proteína determinada. Se entiende por esto que la proteína no es necesariamente detectable en la superficie de la célula, sino que sólo puede estar presente en el interior de la célula. El experto sabe muy bien cómo detectar y/o cuantificar la producción de una proteína dentro de una célula y/o seleccionar células que produzcan dichas proteínas.

El término “monocito diferenciado” se usa en el contexto de la presente invención para referirse a un monocito diferenciado del precursor comprometido denominado precursor de macrófago DC (MDP) que reside principalmente en la médula ósea (pero también podría estar en el bazo) y se diferencia en ya sean células dendríticas o macrófagos. En ratones ellos consisten en dos subpoblaciones principales: (i) células CD11b⁺ con alta expresión de CX3CR1, baja expresión de CCR2 y Ly6C⁻ y (ii) células CD11b⁺ con baja expresión de CX3CR1, alta expresión de CCR2 y Ly6C⁺. Después de abandonar la médula ósea, los monocitos Ly6C⁺ de ratón se diferencian en monocitos Ly6C⁻ en circulación. De manera similar, en la diferenciación de monocitos humanos, se acepta que los monocitos clásicos CD14⁺⁺ abandonan la médula ósea y se diferencian en monocitos intermedios CD14⁺⁺CD16⁺ y secuencialmente a monocitos no clásicos CD14⁺CD16⁺⁺ en la circulación sanguínea periférica (Yang et al. 2014; Biomark Res 2(1) doi. 10.1186/2050-7771-2-1).

Los macrófagos son fagocitos profesionales y células presentadoras de antígenos (APC) residentes en los tejidos, que se diferencian de los monocitos circulantes de sangre periférica (PBM). El término “macrófago activado” se utiliza en el contexto de la presente invención para referirse a cualquier macrófago que esté polarizado. La activación de los macrófagos se logra en general mediante incubación con interleucinas, citoquinas y/o factores de crecimiento. En particular, se pueden utilizar IL-4 y M-CSF como agentes activadores. Los macrófagos activados de diferentes fenotipos se clasifican en macrófagos M1, macrófagos clásicamente activados (CAM) y macrófagos M2, macrófagos alternativamente activados (AAM). Los macrófagos M1 activados clásicamente comprenden células efectoras inmunes con un fenotipo inflamatorio agudo. Estos son muy agresivos contra las bacterias y producen grandes cantidades de linfocinas (Murray y Wynn, 2011, J Leukoc Biol, 89(4):557-63). Los macrófagos M2 antiinflamatorios alternativamente activados se pueden separar en al menos tres subgrupos. Estos subtipos tienen diversas funciones diferentes, incluida la regulación de la inmunidad, el mantenimiento de la tolerancia y la reparación de tejidos/cicatrización de heridas. El término “inductor M1” se utiliza en el contexto de la presente invención para referirse a un compuesto que dirige la diferenciación de PBM a macrófagos del tipo M1. El término “inductor de M2” se utiliza en el contexto de la presente invención para referirse a un compuesto que dirige la diferenciación de PBM a macrófagos del tipo M2. El experto conoce un gran número de formas de promover la diferenciación en macrófagos M1 o M2.

El término “fagocitosis por macrófagos” es el proceso mediante el cual un macrófago engulle una partícula sólida para formar una vesícula interna conocida como fagosoma.

El término “proteína fijadora de hierro”, tal como se utiliza, se refiere a una proteína que se une de forma no covalente a un ion hierro. Ejemplos de tales proteínas comprenden ferritina, hemoglobina, transferrina; y lactoferrina. Las proteínas fijadoras de hierro están unidas por receptores de la superficie celular que facilitan la internalización de estas proteínas en las células.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un sistema de suministro con objetivo aislado y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipiente(s) adecuado(s), en donde el sistema de suministro con objetivo aislado comprende una célula de leucocitos CD45⁺ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, en donde el marcador (i) se selecciona entre un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido detectable y un agente de contraste, o (ii) comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes; y en donde en el complejo (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos de forma covalente y/o no covalente, o (ii) el marcador está atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o enlace no covalente.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que leucocitos CD45⁺, preferiblemente monocitos o monocitos activados y macrófagos, preferiblemente macrófagos activados, preferiblemente macrófagos M1, más preferiblemente macrófagos M2 adquieren el marcador y entregan el marcador en la cantidad suficiente para ser detectados usando sistemas de imágenes para permitir que se usen para rastrear su ubicación en el cuerpo. En caso de CD45⁺ esto era especialmente preferible en el caso de monocitos y monocitos activados, macrófagos, macrófagos activados, preferiblemente macrófagos M1 y muy preferiblemente macrófagos M2. La administración de células cargadas con un marcador (¹⁸F-FDG), preferiblemente un marcador radiactivo, puede visualizar el órgano con acumulación de células marcadas, preferiblemente mediante imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET). Por consiguiente, se describe, pero no forma parte de la invención, un sistema de marcador de suministro objetivo aislado que comprende una célula de leucocito CD45⁺, preferiblemente capaz de marcarse con uno o más marcadores, preferiblemente radiomarcadores o sus conjugados y combinaciones. En dicho sistema de suministro con objetivo aislado, la célula está directamente unida o marcada con un marcador. El marcador puede estar dentro de dicha célula, o en su superficie, preferiblemente está en la superficie de la célula.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de suministro con objetivo aislado que comprende una célula de leucocitos CD45⁺ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, para uso en un método de diagnóstico *in vivo*; donde en el complejo: (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos de forma covalente y/o no covalente, o (ii) el marcador está atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o no covalente.

Las siguientes realizaciones preferidas especifican adicionalmente el primer y segundo aspecto de la presente invención.

La capacidad de una célula de leucocito CD45⁺ dada o una población celular para internalizar las proteínas fijadoras de hierro depende de la expresión de los receptores implicados en este proceso de internalización. Los receptores que conducen a la internalización de ferritina comprenden, por ejemplo, TfR, CXCR4, CD163 y TIM-2. El experto sabe bien cómo medir la cantidad de absorción de una proteína fijadora de hierro y el método preferido para medir la absorción se describe en la sección de ejemplos siguiente. Los presentes inventores también observaron que las subpoblaciones de células de leucocitos CD45⁺ tienen una cierta propensión a internalizar una proteína fijadora de hierro sobre otra proteína fijadora de hierro y, por lo tanto, pueden alcanzar concentraciones de complejo más altas y/o mostrar menos fuga del complejo de las células. Tales subpoblaciones de leucocitos CD45⁺ se describen con más detalle a continuación.

La frase "complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador" tal como se usa en el contexto de la presente invención se refiere a una composición en la que una o más moléculas del marcador están unidas covalente o no covalentemente a una o más proteínas fijadoras de hierro. La unión covalente o no covalente entre una o más proteínas fijadoras de hierro y el uno más marcador puede ser directo o indirecto. En el último caso, el marcador está unido a la proteína fijadora de hierro mediante un conector o espaciador. El experto en la técnica conoce enlazadores o espaciadores, tales como polialanina, poliglicina, carbohidratos, grupo (CH₂)_n o conectores polipeptídicos. Por lo tanto, el experto en la técnica podrá seleccionar los respectivos enlazadores o espaciadores adecuados dependiendo de la aplicación respectiva. Si las proteínas fijadoras de hierro forman jaulas como, por ejemplo ferritina, que el término "complejo" también abarca el encerramiento del marcador dentro de la jaula incluso en ausencia de un enlace covalente o no covalente entre la(s) proteína(s) y el(los) compuesto(s) activo(s). La formación del complejo permite el transporte del marcador al interior de la célula cuando la célula está internalizando la proteína fijadora de hierro. Por lo tanto, se prefiere que el marcador esté unido a la proteína fijadora de hierro de una manera que no interfiera con el mecanismo de transporte. Esto puede ser probado fácilmente por un experto usando ensayos de absorción conocidos en la técnica y descritos en la Sección de Ejemplos a continuación. Se prefiere que el complejo sea suficientemente estable para sobrevivir al transporte dentro de la célula a la región objetivo dentro del cuerpo. Por lo tanto, se prefiere que el complejo en lugar del marcador solo se entregue a las células o al interior de las células en la región objetivo. Esta propiedad también reduce los posibles efectos nocivos, por ejemplo, citotoxicidad, del marcador para el leucocito CD45⁺. Si los marcadores están acoplados covalentemente a las proteínas fijadoras de hierro, dicho acoplamiento se realiza preferiblemente a través de residuos de aminoácidos que se sabe que están ubicados en áreas superficiales que no están implicadas en la unión a los receptores celulares necesarios para la absorción celular de las proteínas fijadoras de hierro. Las proteínas fijadoras de hierro utilizadas en el contexto de la presente invención pueden formar complejos estables unidos de forma no covalente con una amplia variedad de marcadores.

El leucocito CD45⁺ se origina en el paciente a tratar, en tal caso la célula cargada con el complejo sería autóloga del paciente. También se prevé que los pacientes sean tipificados en MHC antes del tratamiento con el suministro objetivo de la presente invención y que el tipo de célula de leucocitos utilizada para un paciente determinado sea MHC compatible con el paciente. En estas dos realizaciones preferidas el leucocito CD45⁺ es una célula primaria o se deriva de una célula primaria mediante un número reducido de etapas de diferenciación. Alternativamente, el leucocito CD45⁺ puede ser de una línea celular de leucocito CD45⁺ inmortalizada pero preferiblemente no transformada. Así, la sangre utilizada para el leucocito CD45⁺ preferiblemente el aislamiento macrófago, se obtiene preferiblemente del paciente a tratar o de un donante sano. Alternativamente, la sangre se puede obtener del banco de sangre. También se considera aquí el uso de sangre de cordón umbilical.

Los presentes inventores observaron que una subpoblación de leucocitos CD45⁺, que se pueden producir a partir de una célula precursora CD34⁺ hematopoyéticas son particularmente adecuadas para la administración específica del marcador. Por consiguiente, se prefiere que los leucocitos usados para producir el sistema de suministro con objetivo deriven de células precursoras hematopoyéticas CD34⁺. El experto sabe muy bien cómo seleccionar células precursoras hematopoyéticas CD34⁺ y cómo diferenciar tales células en leucocitos.

Preferiblemente, el leucocito CD45⁺ se selecciona del grupo formado por un monocito, un monocito diferenciado, un linfocito y un granulocito. Las subpoblaciones preferidas en estas categorías generales de leucocitos se definen a continuación mediante parámetros estructurales, por ejemplo presencia o ausencia de una proteína determinada, propiedades funcionales y/o método de su producción/diferenciación. Como se describió anteriormente, el sistema de suministro con objetivo de la presente invención todavía proporciona las ventajas descritas anteriormente, si en una población de células no todas las células tienen una propiedad particular, siempre y cuando la mayoría de las células dentro de esa población tengan esa propiedad. Por lo tanto, a continuación se divulga la propiedad de una célula preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención. El experto apreciará que una composición

farmacéutica de la presente invención comprenderá millones de células y que no todas las células dentro de la población tendrán las propiedades funcionales y/o estructurales descritas en el presente documento pero que, no obstante, la composición farmacéutica se puede usar para tratar una enfermedad, si la mayoría de las células comparten las respectivas propiedades funcionales y/o estructurales.

- 5 Los presentes inventores han reconocido que las subpoblaciones de Leucocitos CD45⁺ tienen propiedades ventajosas particulares que incluyen, entre otras, eficiencia y/cantidad de absorción del complejo en general, capacidad para retener el complejo dentro de la célula, es decir, para evitar fugas y la liberación objetivo del marcador, eficiencia de absorción de una proteína fijadora de hierro particular y/o dirigirse a tejidos o células particulares y, por lo tanto, idoneidad para tratar o mejorar una enfermedad particular. Los presentes inventores han observado, por ejemplo, que
- 10 leucocitos CD45⁺, que expresan uno o más de los siguientes antígenos: CD204, CD206, CD200R, CCR2 tienen preferencia por la captación de ferritina sobre la captación de otras proteínas transportadoras de hierro. Por lo tanto, si la proteína fijadora de hierro en el complejo es ferritina, se prefiere seleccionar leucocitos CD45⁺ que expresan uno o más de los siguientes antígenos: CD204, CD206, CD200R, CCR2. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención
- 15 (i) el monocito es un monocito CD11b⁺, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un monocito CD11b⁺ CD14⁺, un monocito CD11b⁺ CD16⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD16⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ MHCII⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD115⁺, monocito CD11b⁺ CD114⁺, monocito CD11b⁺ CD116⁺, monocito CD11b⁺ CCR1⁺, monocito CD11b⁺ CCR2⁺, monocito CD11b⁺ CX3CR⁺, monocito CD11b⁺ CXR4⁺, monocito CD11b⁺ CXR6⁺ y un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD33⁺;
- 20 (ii) el monocito diferenciado se selecciona del grupo que consiste en un macrófago, un macrófago activado, preferiblemente un macrófago CD11b⁺, más preferiblemente un macrófago CD11b⁺ CD16⁺, macrófago CD11b⁺ CD32⁺, macrófago CD11b⁺ CD64⁺, macrófago CD11b⁺ CD68⁺, preferiblemente un macrófago CD11b⁺ CD86⁺, M1, que produce preferiblemente óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y/o secreta interleucina 12 (IL-12) o preferiblemente macrófago CD11b⁺ CCR2⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD204⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD206⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD204⁺
- 25 CD206⁺ M2, macrófago CD11b⁺ complejo mayor de histocompatibilidad II⁺ (MHCII⁺) (expresión baja o alta) M2, macrófago CD11b⁺ CD200R⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD163⁺ M2 o macrófagos activados que producen y/o secretan arginasa-1 y/o interleucina 10 (IL-10); o una célula dendrítica, preferiblemente con expresión de CD11b CD11c, CD11b CD80, CD11c CD80, CD11c CD86, CD11c MHCII y CD11c CD123, preferiblemente el monocito diferenciado no es una célula espumosa que expresa el receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidado similar a la lectina (Lox1⁺),
- 30 receptor de quimiocina C-X-C tipo 7 (CXCR7⁺) y factor nuclear (2 derivado de eritroide) similar a 2 (NRF2⁺). Una célula espumosa es un tipo de macrófago que se localiza en depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos, donde ingieren lipoproteínas de baja densidad y se cargan con lípidos, dándoles una apariencia espumosa. Estas células secretan diversas sustancias implicadas en el crecimiento de la placa y su muerte promueve la inflamación, contribuyendo así a la enfermedad cardiovascular;
- 35 (iii) monocito o monocito activado que expresa al menos un receptor de quimiocina, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en CCR1, CCR2, CXR4 y CXR6, o al menos un receptor del factor de crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en receptor del factor estimulante de colonias de macrófago (CD 115), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (CD114) y receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (que consiste de CD116 y CD131); los monocitos de estas características son particularmente adecuados
- 40 para tratar afecciones inflamatorias y cáncer;
- (iv) el linfocito se selecciona del grupo que consiste en un linfocito T CD3⁺ y CD4⁺ o CD8⁺, o un linfocito B CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD21⁺, CD20⁺ CD21⁺, o CD19⁺ CD20⁺ CD21⁺; o
- (v) el granulocito se selecciona del grupo que consiste en un neutrófilo, preferiblemente un neutrófilo CD66b⁺, un eosinófilo y un basófilo, preferiblemente un eosinófilo CD193⁺.
- 45 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el macrófago activado:
- (i) es producible por incubación *in vitro* de un monocito o macrófago o sus precursores con un factor capaz de alterar marcadores de expresión en macrófagos, preferiblemente
- (a) con al menos un inductor M1,
- (b) con al menos un inductor M2,
- 50 (c) o con un factor capaz de alterar la capacidad de los macrófagos para secretar citocinas, preferiblemente IL-10 e IL-12, quimiocinas y/o para producir iNOS, arginasa u otras enzimas inmunomoduladoras; ejemplos de tales factores son: plaquetas activadas, IL-4, IL-10, IL-13, complejo inmunológico de un antígeno y anticuerpo, IgG, gammaglobulina activada por calor, glucocorticosteroide, factor de crecimiento tumoral β (TGF-β), IL-1R, ligando 2 de quimiocina CC (CCL-2), IL-6, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), agonista del receptor activado por proliferador de peroxisomas γ (PPARγ), factor inhibidor de leucocitos (LIF), adenosina, infección por helmintos y hongos,
- 55 lipopolisacárido (LPS), interferón γ (INF-γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e infección viral y bacteriana; a este respecto se observó que la activación de un monocito con un inductor M1,

particularmente LPS, hará que la célula exprese iNOS, que la activación de un monocito con un inductor M1, particularmente LPS, hará que la célula no exprese Arginasa-1, que la activación de un monocito con un inductor de M2, particularmente IL-4, hará que la célula exprese Arginasa-1, y esa activación de un monocito con un inductor de M2, particularmente IL-4, hará que la célula no exprese iNOS,

5 (ii) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: CD64, CD86, CD16, CD32, alta expresión de MHCII y/o producción de iNOS y/o IL-12;

(iii) es producible por incubación *in vitro* de un monocito o macrófago con un factor capaz de inducir la capacidad del macrófago para fagocitar, por ejemplo IL-18, opsoninas (por ejemplo proteínas derivadas del complemento tales como iC3b, inmunoglobulina G), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), lipopolisacárido (LPS), interferón y (INF- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), infección viral y/o infección bacteriana;

10 (iv) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: CD204, CD206, CD200R; CCR2, receptor de transferrina (TfR), receptor de quimiocina motriz CXC 4 (CXCR4), CD163, y/o dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 2 (TIM-2), y/o muestran una baja expresión de MHCII; los macrófagos activados que tienen estas propiedades son particularmente adecuados para complejos que contienen ferritina como proteína de unión al hierro;

(v) tiene la capacidad de fagocitar; y/o

(vi) es capaz de secreción de citoquinas, preferiblemente IL-12 o IL-10, o producción de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (u otros compuestos proinflamatorios), arginasa u otros compuestos inmunosupresores/antiinflamatorios.

20 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el inductor M1 para diferenciar macrófagos en macrófagos M1 se selecciona del grupo que consiste en lipopolisacárido (LPS), interferón γ (INF- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e infección viral y bacteriana y el inductor M2 para diferenciar macrófagos en macrófagos M2 se selecciona del grupo que consiste en IL-4, IL-10, IL-13, complejo inmune de un antígeno y anticuerpo, IgG, gamma-globulina activada por calor, glucocorticoesteroide, factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), IL-1R, ligando 2 de quimiocina CC (CCL-2), IL-6, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), agonista receptor activado por proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ), factor inhibidor de leucocitos (LIF), adenosina, helmintos e infección por hongos.

25 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que tanto los macrófagos M1 cargados con complejos como los macrófagos M2 son adecuados para el suministro objetivo de agente activo a tejidos hipóxicos, preferiblemente un tumor o su metástasis. En general, observamos que del 3 al 5 % de los macrófagos M1 administrados se localizaron en el sitio del tumor, mientras que aproximadamente el 35 % de los macrófagos M2 mostraron una orientación específica del tumor. Sin embargo, esta ventaja general de los macrófagos M2 se vio compensada cuando se utilizó un complejo que comprende hemoglobina y un marcador, ya que se pudieron cargar cantidades significativamente mayores de este complejo en los macrófagos M1 que en los macrófagos M2.

30 Generalmente, estos tropismos específicos hacen que los macrófagos M2 sean más adecuados para tratar tumores y enfermedades caracterizadas por tejido hipóxico.

En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el monocito:

(i) se puede producir a partir de una célula precursora hematopoyética CD34⁺;

40 (ii) es producible por incubación *in vitro* de monocitos con al menos un inductor, preferiblemente un inductor M1 o M2, más preferiblemente al menos un inductor M2;

(iii) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: TfR, CD163, TIM-2, CD14, CD16, CD33 y/o CD115;

(iv) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: TfR, CD163, TIM-2, CXCR4, CD14 y/o CD16; y/o

45 (v) tiene la capacidad de fagocitar.

En esta realización del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el inductor M1 para diferenciar monocitos se selecciona del grupo que consiste en LPS, INF- γ , GM-CSF o infección viral o bacteriana o el inductor M2 para diferenciar monocitos se selecciona del grupo que consiste de IL-4, IL-10, IL-13, el complejo inmune de un antígeno y anticuerpo, IgG, gammaglobulinas activadas por calor, glucocorticosteroides, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, agonista de PPAR γ , factor inhibidor de leucocitos (LIF), medio condicionado por cáncer, células cancerosas, adenosina y helmintos o infección por hongos.

50 Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que los monocitos son adecuados para el suministro objetivo de agente activo a tejidos hipóxicos, preferiblemente el tumor o su metástasis, mientras que los monocitos tratados con activadores M2 son más adecuados para el suministro objetivo de agente activo a tejidos hipóxicos,

preferiblemente el tumor o su metástasis. Estos tropismos específicos hacen que los monocitos tratados con activadores M2 sean más adecuados para atacar tumores y sitios hipóxicos.

En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el linfocito:

5 (i) se puede obtener a partir de sangre, bazo o médula ósea o se puede producir a partir de célula precursora CD34⁺ conocida por el experto y también descrita en, por ejemplo, Lefort y Kim, 2010, *J Vis Exp* 40: 2017; Tassone y Fidler, 2012, *Methods in Molecular Biology* 882: 351-357; Kouro et al. 2005, *Current Protocols in Immunology*, 66:F22F.1:22F.1.1-22F.1.9.;

(ii) es un linfocito inmunológicamente competente;

(iii) expresa receptores de células T específicos de antígeno; y/o

10 (iv) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: (a) antígeno CD3 y CD4 o CD8 o (b): CD19, CD20, CD21, CD19 CD20, CD19 CD21, CD20 CD21 o CD19 CD20 CD21, y preferiblemente es capaz de producir inmunoglobulinas.

En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el granulocito:

15 (i) se puede obtener a partir de sangre, bazo o médula ósea o se puede producir a partir de una célula precursora CD34⁺ como se describió, por ejemplo en Kuhs et al. 2015, *Curr Protoc Immunol* 111:7.23-1-7.23.16; Coquery et al. 2012, *Cytometry A* 81(9): 806-814; Swemydas y Lionakis 2013, *J Vis Exp* 77: 50586.;

(ii) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes CD66b y/o CD 193;

(iii) es un leucocito polimorfonuclear caracterizado por la presencia de gránulos en su citoplasma; y/o

(iii) se caracteriza por la expresión de al menos uno de los siguientes: TfR, CD163, TIM-2 y/o CXCR4.

20 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, la proteína fijadora de hierro se selecciona del grupo que consiste en ferritina, preferiblemente ferritina de tipo pesado (H), ferritina ligera (L) y/o ferritina mitocondrial; hemoglobina, preferiblemente hemoglobina A, hemoglobina AS, hemoglobina SC, hemoglobina C, hemoglobina D, hemoglobina E, hemoglobina F, hemoglobina H; complejo hemoglobina-haptoglobina, hemopexina, transferrina; y lactoferrina. Los términos ferritina; hemoglobina, preferiblemente hemoglobina A, hemoglobina AS, hemoglobina SC, hemoglobina C, hemoglobina D, hemoglobina E, hemoglobina F, hemoglobina H; complejo hemoglobina-haptoglobina, hemopexina, transferrina; y la lactoferrina abarca variantes estructurales de las proteínas naturales y, por lo tanto, se refiere a proteínas que tienen al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, más preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 %, más preferiblemente al menos el 100 % de la capacidad de la proteína de tipo salvaje respectiva para unirse a iones de hierro. Las proteínas fijadoras de hierro utilizadas en el contexto de la presente invención son preferiblemente de mamífero, más preferiblemente de ratón, rata, perro, simio, en particular chimpancé o humano, lo más preferiblemente de origen humano. Las secuencias de consenso de las proteínas fijadoras de hierro preferidas utilizadas en el contexto de la presente invención se muestran en la Figura 1 a continuación. Las variantes estructurales preferidas se basan en las secuencias indicadas en la Figura 1. Los residuos marcados con X varían entre diferentes ferritinas, transferrinas y hemoglobinas de mamíferos. La alteración de estos residuos no es crucial para la capacidad de las proteínas de unirse a los iones de hierro. Por consiguiente, se prefiere que las mutaciones o deleciones de aminoácidos afecten a uno o más de los residuos marcados con una X.

25

30

35

Las proteínas plasmáticas siempre han sido vehículos privilegiados para la administración de ingredientes farmacéuticos activos en la terapia del cáncer. Así, la albúmina, la proteína plasmática más abundante, se utiliza actualmente en protocolos terapéuticos para la liberación de moléculas de taxano y derivados de doxorubicina (Larsen MT et al. 2016, *Mol Cell Ther* 27;4:3).

40

Las proteínas humanas transferrina y ferritina se han considerado portadores eficaces para la administración de pequeñas moléculas dirigidas específicamente a las células cancerosas. Hasta la fecha, a pesar de los esfuerzos considerables, ningún complejo de transferrina o ferritina ha llegado a la clínica con éxito (Luck AN et al. 2013, *Adv Drug Deliv Rev.* 65(8):1012-9).

45

La ferritina tiene una arquitectura de jaula y capacidad de unión al hierro que podría usarse para encapsular marcadores dentro de su cavidad. Las ferritinas no abundan en el plasma, pero pueden producirse fácilmente con alto rendimiento como proteínas recombinantes en vectores de expresión de proteínas comunes, como las células de *Escherichia coli*. Las cadenas H o L de ferritina están codificadas como un pequeño monómero proteico (21 kDa y 19 kDa para las cadenas H y L, respectivamente) capaz de ensamblarse 24 unidades en una estructura similar a una jaula, que delimita una cavidad de 8 nm de diámetro. Los presentes inventores observaron en el contexto del trabajo en la presente invención que los homopolímeros de H-ferritina representan una construcción proteica preferida para administrar específicamente fármacos encapsulados a células de leucocitos CD45⁺ que expresan TfR. Además, la

50

ferritina h se dirige a marcadores complejados en el núcleo celular (y, por lo tanto, suministra directamente proteínas de unión al ADN al núcleo).

5 La transferrina purificada se puede conjugar eficientemente con diversas moléculas a través de enlaces covalentes que se liberan adecuadamente dentro de las células (Beyer U et al. 1998, J Med Chem. 41(15):2701-2708). En el caso de la transferrina, sólo los grupos lisina en la superficie de la proteína están disponibles para la unión covalente.

10 La hemoglobina ha sido considerada en el pasado como portador, debido a su versatilidad en la conjugación química con diversas moléculas, su abundancia y relativa estabilidad en la sangre (Somatogen, 1993, WO1993008842 A1). Sin embargo, la falta de propiedades dirigidas a los receptores no fomentó aplicaciones biomédicas distintas de los sustitutos de la sangre o los agentes antidrepanocíticos. De hecho, la Hb sólo puede ser reconocida por los epítomos CD163 (receptor de haptoglobina/hemoglobina) en los leucocitos, especialmente los de origen monocito-macrófago. El leucocito CD45⁺, en particular la administración de proteínas basada en macrófagos, descrita en esta solicitud, movieron a la hemoglobina al centro del escenario como portador de marcadores objetivo específico. La hemoglobina se puede unir fácilmente de forma covalente a marcadores apropiados, albergar moléculas marcadoras hidrófobas dentro del bolsillo de unión del hemo, mediante el intercambio de porfirinas fluorescentes libres de hemo o porfirinas acopladas a un radiomarcador o incluso transportar pequeñas moléculas combinadas con un marcador unido al hierro hemo. La Hb se puede modificar fácilmente mediante la unión selectiva del conjugado marcador apropiado al residuo de cisteína beta93, la única cisteína titulable en la superficie de la proteína. Los marcadores funcionalizados con maleimido son ejemplos de marcadores que se pueden unir fácil y específicamente al residuo cys beta93 relevante. Alternativamente, los residuos de lisina en la superficie de la Hb (al menos 10 residuos de lisina titulables por tetrámero de Hb) pueden ser fácilmente susceptibles de conjugación de marcador a través de conectores de succinimida escindibles. La hemoglobina también ofrece una capacidad única de liberar grupos hemo unidos de forma no covalente a valores de pH ácidos. La apohemoglobina así obtenida es capaz de albergar varias moléculas hidrófobas dentro de la bolsa hemo vacía dotada de notables propiedades de fluorescencia (por ejemplo, cloro e6, hipericina, derivados de ftalocianina) (Dong J et al. J Photochem Photobiol B 2014, 140:163-172).

25 Cualquiera que sea el método de conjugación/adsorción/unión, las presentes invenciones demostraron que la hemoglobina (Hb), la transferrina (Tf) y las ferritinas son portadores privilegiados de marcadores, una vez cargados en sistemas celulares apropiados con propiedades dirigidas a tumores, por ejemplo, macrófagos activados. El procedimiento de purificación fácil, rápido, económico y seguro de estas proteínas también proporciona un enorme valor añadido.

30 Basándose en secuencias de ferritinas de tipo H, ferritinas de tipo L, cadenas alfa de hemoglobina, cadenas beta de hemoglobina y transferrinas de mamíferos, se determinó una secuencia consenso para cada una de estas proteínas. Estos se muestran en la Figura 1 en SEQ ID NO: 2, 7, 9, 14, 16, 20 y 25, respectivamente). Sobre esta base, pero también sobre la base del análisis de delección y estructural divulgado en la técnica anterior, se determinó un fragmento mínimo para ferritinas de tipo H, ferritinas de tipo L, cadenas alfa de hemoglobina y cadenas beta de hemoglobina suficiente para la absorción por leucocitos CD45⁺. Estos se muestran en SEQ ID NO: 1, 3, 5 (ferritina tipo H); 8, 10, 12 (ferritina tipo L), 15 y 17 (cadena alfa de hemoglobina) y 19 y 21 (cadena beta de hemoglobina). La transferrina comprende un dominio ubicado en el extremo N y un dominio ubicado en el extremo C que son necesarios para la unión del hierro y la captación por leucocitos CD45⁺, si están comprendidos en un polipéptido y están situados entre 100 a 450 aminoácidos de distancia, preferiblemente entre 150 a 400, más preferiblemente entre 200 a 350 aminoácidos y más preferiblemente entre 250 a 320 aminoácidos. El dominio N-terminal comprende los aminoácidos 1 a 82 de la transferrina consenso de longitud completa (SEQ ID NO: 25) o transferrina humana de longitud completa (SEQ ID NO: 28). El dominio C-terminal comprende los aminoácidos 396 a 510 de la transferrina consenso de longitud completa (SEQ ID NO: 25) o transferrina humana de longitud completa (SEQ ID NO: 28). En cada caso se indica una X en la secuencia consenso que ésta representa independientemente para cualquier aminoácido y caracteriza un aminoácido que no está o está mal conservado entre las ferritinas de tipo h de los mamíferos, que puede mutarse sin o con poco detrimento de las propiedades de unión al hierro de la respectiva proteína de unión al hierro. Se prefiere que X adopte en cada caso el significado del aminoácido de la respectiva proteína de unión al hierro humana que se alinea con X. Esta información puede tomarse, por ejemplo de la Figura 1, que muestra alineamientos de las secuencias consenso con proteínas humanas y, en algunos casos, de ratón.

50 Las ferritinas de tipo h preferidas comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1 y variantes de la misma que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo h que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 para ser tomado por los leucocitos CD45⁺, preferiblemente leucocitos M2. Dentro de SEQ ID NO: 1 X en la posición 5 puede estar presente o ausente, si está presente significa cualquier aminoácido, preferiblemente Ile, X en la posición 6 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Asn, X en la posición 14 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Tyr, X en la posición 24 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Tyr o Cys, X en la posición 66 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Phe, X en la posición 68 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Gln, X en la posición 75 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Arg o Cys, X en la posición 90 significa cualquier aminoácido, preferiblemente His, X en la posición 94 significa cualquier aminoácido,

preferiblemente Ser o Asn, X en la posición 120 puede estar presente o ausente, si está presente significa cualquier aminoácido, preferiblemente His o Tyr, más preferiblemente His, X en la posición 123 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Asn o Ser, más preferiblemente Asn, X en la posición 128 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ala.

5 En una realización preferida, la ferritina de tipo H comprende o consiste en ferritina murina de acuerdo con SEQ ID NO: 3. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo H que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 para ser ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

10 En una realización preferida, la ferritina de tipo H comprende o consiste en ferritina humana de acuerdo con SEQ ID NO: 5. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo h que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 5 serán ocupados por los leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

20 En una realización preferida, la ferritina de tipo h comprende o consiste en una secuencia consenso de mamífero derivada de alinear ferritinas de tipo h de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 7, siendo preferido 2. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo h que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o 7, siendo preferible que 2 sea ocupado por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2. En SEQ ID NO: 2 X en la posición 6 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro, X en la posición 14 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente His, X en la posición 16 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp, X en la posición 21 puede estar presente o ausente, si está presente significa cualquier aminoácido, preferiblemente Ile, X en la posición 22 significa cualquier aminoácido, preferiblemente Asn, X en la posición 30 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr, X en la posición 40 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Cys, más preferiblemente Tyr, X en la posición 82 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Phe, X en la posición 84 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Gln, X en la posición 91 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Arg o Cys, más preferiblemente Cys, X en la posición 106 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente His, X en la posición 110 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asn o Ser, más preferiblemente Asn, X en la posición 137 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente His o Tyr, más preferiblemente His, X en la posición 140 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asn o Ser, más preferiblemente Asn, X en la posición 145 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ala, X en la posición 164 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ser, X en la posición 166 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Leu, preferiblemente Leu, X en la posición 178 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o His, más preferiblemente Asp, X en la posición 181 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asn, X en la posición 182 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu, X en la posición 183 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser. En SEQ ID NO: 7 X en la posición 6 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro X en la posición 14 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente His, X en la posición 16 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp, X en la posición 21 puede estar presente o ausente, si está presente significa cualquier aminoácido, preferiblemente Ile, X en la posición 29 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr, X en la posición 81 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Phe, X en la posición 83 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Gln, X en la posición 105 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente His, X en la posición 144 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ala, X en la posición 180 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asn, X en la posición 181 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu, X en la posición 182 está ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser.

50 En una realización preferida, la ferritina de tipo h comprende o consiste en ferritina murina de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 4 se prefiere. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo h

murina que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

5 En una realización preferida, la ferritina de tipo h comprende o consiste en ferritina humana de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 6 se prefiere. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina humana de tipo h que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 6 serán ocupados por leucocitos
10 CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

Las ferritinas de tipo L preferidas comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 8 y variantes de los mismos que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un
15 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo L que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 8 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente leucocitos M2. En SEQ ID NO: 8 X en la posición 5 puede ser cualquier aminoácido natural, preferiblemente Asp o Glu, más preferiblemente Asp, X en la posición 12 puede ser cualquier aminoácido natural, preferiblemente Arg o Ser, más preferiblemente Ser, X en la posición 17 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Arg, más preferiblemente Ser, X en la posición 19
20 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Arg o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 29 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Phe, X en la posición 30 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Phe, más preferiblemente Tyr, X en la posición 42 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Gly, más preferiblemente Ser, X en la posición 56 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Tyr, más preferiblemente Tyr, X en la posición 61
25 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Lys, más preferiblemente Lys, X en la posición 62 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Phe, más preferiblemente Met, X en la posición 65 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 75 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ile o Val, más preferiblemente Ile, X en la posición 76 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Gln, más preferiblemente Lys, X en la posición 79 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ala, X en la posición 80 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 87 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro o Gln, más preferiblemente Pro, X en la posición 88 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente
30 Glu o Asp, más preferiblemente Asp, X en la posición 91 puede ser cualquier aminoácido natural, preferiblemente Glu o Lys, más preferiblemente Lys, X en la posición 94 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Leu, más preferiblemente Leu, X en la posición 96 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Leu, más preferiblemente Met, X en la posición 99 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Asn, preferiblemente Lys, X en la posición 115 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Thr o Ala, más preferiblemente Thr, X en la posición 119 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Leu, X en la posición 125 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Thr, más preferiblemente Thr, X en la posición 127 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Phe, más preferiblemente Phe, X en la posición 130 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Glu, más preferiblemente Glu, X en la posición 140 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Asn, más preferiblemente Asp, X en la posición 146 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Arg o His, más preferiblemente His, y X en la posición 148
40 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Leu o Val, más preferiblemente Leu.
45

50 En una realización preferida, la ferritina de tipo L comprende o consiste en ferritina de tipo L murina de acuerdo con SEQ ID NO: 10. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo L que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 10 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.
55

60 En una realización preferida, la ferritina de tipo L comprende o consiste en ferritina humana de acuerdo con SEQ ID NO: 12. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo L que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 12 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

En una realización preferida, la ferritina de tipo L comprende o consiste en una secuencia consenso de mamífero derivada de alinear ferritinas de tipo h de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 9 o 14, siendo preferido el 9. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo L que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 9 o 14, siendo preferible que 9 sea ocupado por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2. En SEQ ID NO: 9 X en la posición 12 X en la posición 12 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Glu, más preferiblemente Asp, X en la posición 19 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Arg, más preferiblemente Ser, X en la posición 24 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Arg, más preferiblemente Ser, X en la posición 26 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Arg o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 36 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Phe, X en la posición 37 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Phe, más preferiblemente Tyr, X en la posición 47 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Gly, más preferiblemente Ser, X en la posición 63 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Tyr, más preferiblemente Tyr, X en la posición 68 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Lys, más preferiblemente Lys, X en la posición 69 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Phe, más preferiblemente Met, X en la posición 72 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 82 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ile o Val, más preferiblemente Ile, X en la posición 83 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Gln, más preferiblemente Lys, X en la posición 86 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala o Ser, más preferiblemente Ala, X en la posición 87 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Gln, más preferiblemente Gln, X en la posición 94 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro o Gln, más preferiblemente Pro, X en la posición 95 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Asp, más preferiblemente Asp, X en la posición 98 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Glu o Lys, más preferiblemente Lys, X en la posición 101 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Leu, más preferiblemente Leu, X en la posición 103 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Met o Leu, más preferiblemente Met, X en la posición 106 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Asn, preferiblemente Lys, X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, X en la posición 126 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Leu, X en la posición 132 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ser o Thr, más preferiblemente Thr, X en la posición 134 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Phe, más preferiblemente Phe, X en la posición 137 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Glu, más preferiblemente Glu, X en la posición 147 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Asn, más preferiblemente Asp, X en la posición 153 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Arg o His, más preferiblemente His, X en la posición 155 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Leu o Val, más preferiblemente Leu, X en la posición 161 puede estar ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Ala, X en la posición 163 puede estar ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Thr, X en la posición 166 puede estar ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro, y X en la posición 168 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Gly o Ala, más preferiblemente Ala. En SEQ ID NO: 14 X en la posición 36 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Phe, X en la posición 37 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Tyr o Phe, más preferiblemente Tyr, X en la posición 94 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro o Gln, más preferiblemente Pro, X en la posición 126 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Leu, X en la posición 137 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Lys o Glu, más preferiblemente Glu, X en la posición 147 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Asp o Asn, más preferiblemente Asp, X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, X en la posición 163 puede estar ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Thr, X en la posición 166 puede estar ausente o cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Pro, X en la posición 168 puede ser cualquier aminoácido de origen natural, preferiblemente Gly o Ala, más preferiblemente Ala.

En una realización preferida, la ferritina tipo L comprende o consiste en ferritina murina de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 11 se prefiere. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una ferritina de tipo L murina que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 11 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

En una realización preferida, la ferritina tipo L comprende o consiste en ferritina humana de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 13 se prefiere. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad

menos un 70 % de la capacidad de una hemoglobina beta constituida por la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 20 será ocupado por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

5 En una realización preferida, la beta hemoglobina comprende o consiste en beta hemoglobina humana de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 22. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una beta hemoglobina humana de longitud completa que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 22 será ocupado por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M2.

10 En una realización preferida, la transferrina comprende o consiste en una secuencia consenso de mamífero derivada de alinear hemoglobinas alfa de longitud completa de acuerdo con SEQ ID NO: 25. Así, particularmente, las transferrinas preferidas comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 25 y de variantes de los mismos que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una transferrina que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 25 será ocupado por leucocitos CD45⁺ preferiblemente macrófagos M1.

20 En una realización preferida, la transferrina comprende o consiste en transferrina humana de acuerdo con SEQ ID NO: 28. Por consiguiente, las variantes estructurales preferidas tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una transferrina que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 28 será ocupado por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M1.

30 Las propiedades de unión al hierro de las transferrinas dependen de un dominio ubicado en el extremo N y en el extremo C. Así, en una realización preferida la transferrina utilizada en la presente invención comprende al menos el dominio N-terminal de acuerdo con SEQ ID NO: 23 y el dominio C-terminal de acuerdo con SEQ ID NO: 24. La transferrina preferida comprende proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 23 y 24 así como variantes de los mismos que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos, y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una transferrina que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 23 y 24 serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M1. SEQ ID NO: 23 o 24 indica una secuencia consenso de transferrinas de mamíferos.

40 Así, en una realización preferida la transferrina utilizada en la presente invención comprende al menos el dominio N-terminal de acuerdo con SEQ ID NO: 26 y el dominio C-terminal de acuerdo con SEQ ID NO: 27. La transferrina preferida comprende proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 26 y 27 así como variantes de los mismos que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 75 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 80 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 85 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos un 95 % de identidad de aminoácidos, y en cada caso al menos un 70 % de la capacidad de una transferrina que consiste de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26 y 27, respectivamente, que serán ocupados por leucocitos CD45⁺, preferiblemente macrófagos M1.

50 Las ferritinas preferidas también comprenden proteínas que, independientemente de la secuencia de aminoácidos dada, se ajustan al conjunto de subunidades de 24 unidades de un módulo proteico de haz de cuatro hélices, que se encuentran dentro de alineamientos de secuencia dados de proteínas lejanamente relacionadas de acuerdo con lo definido por alineamientos basados en estructuras 3D.

55 Es una observación sorprendente de los presentes inventores que los monocitos, macrófagos y preferiblemente macrófagos M2 son capaces de captar la cantidad de marcador suficiente para hacerlos visibles usando métodos de obtención de imágenes en el sitio de su acumulación (por ejemplo, en el tumor o su metástasis, sitio de hipoxia). Sorprendentemente, los inventores se dieron cuenta que los linfocitos y los macrófagos M2 captan mejor los complejos que comprenden una o más ferritina y uno o más marcadores, que los macrófagos M1 captan mejor los complejos que comprenden una o más hemoglobina y uno o más marcadores y que los macrófagos son mejor en la absorción de complejos que comprenden una o más transferrina y uno o más marcadores. En consecuencia, basándose en el tropismo tisular y celular de leucocitos CD45⁺: monocitos, macrófagos M1 y M2, granulocitos y linfocitos, los complejos descritos anteriormente que comprenden una o más ferritina y uno o más marcadores se usan para cargar macrófagos, linfocitos o monocitos M2, si se desea el tropismo de los macrófagos, linfocitos o monocitos M2 y se usan complejos

60

que comprenden una o más hemoglobina y uno o más marcadores para cargar macrófagos M1, si se desea el tropismo de los macrófagos M1.

5 En la composición de diagnóstico del primer aspecto de la presente invención, el marcador (i) se selecciona entre un tinte fluorescente, un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido detectable y un agente de contraste, o (ii) comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes.

10 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo para uso en un método de diagnóstico *in vivo* de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el marcador se selecciona entre un tinte fluorescente, un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un polipéptido detectable o ácido nucleico que codifica dicho polipéptido detectable y un agente de contraste.

En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo para uso en un Método de diagnóstico *in vivo* de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el marcador comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes.

15 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en un ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), trietilentetramina (TETA), ácido iminodiacético, ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DTPA) y ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico (HYNIC).

20 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el agente de contraste comprende un agente paramagnético, preferiblemente seleccionado entre Gd, Eu, W y Mn, o ferrihidruro.

25 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el isótopo emisor de radioisótopo/fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en isótopos emisores de radiación alfa, isótopos emisores de radiación gamma, isótopos emisores de electrones Auger, isótopos emisores de rayos X, isótopos emisores de fluorescencia, tales como ¹⁸F, ⁵¹Cr, ⁶⁵Tb fluorescente, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁴⁹Pm, ¹⁷⁷Iu, ⁴⁷Sc, ¹⁴²Pr, ¹⁵⁹Gd, ²¹²Bi, ⁷²As, ⁷²Se, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ^{101m15}Rh, ¹¹⁹Sb, ¹²⁸Ba, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ¹⁹⁷Hg, ²¹¹At, ¹⁶⁹Eu, ²⁰³Pb, ²¹²Pb, ⁶⁴Cu, ⁸⁹Zr, ⁶⁷Cu, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁹⁸Au y ¹⁹⁹Ag, así como conjugados y combinaciones de los anteriores con proteínas, péptidos, inhibidores moleculares pequeños, anticuerpos u otros compuestos (por ejemplo ¹⁸F-FDG o ⁶⁴Cu-porfirina).

30 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo de la presente invención, el tinte fluorescente se selecciona del grupo que consiste en las siguientes clases de tintes fluorescentes: Xantenos, acridinas, oxazinas, cininas, tintes de estirilo, cumarinas, porfinas, complejos de ligandos metálicos, proteínas fluorescentes, nanocristales, perilenos y ftalocianinas, así como conjugados y combinaciones de estas clases de tintes.

35 En una realización preferida del sistema de suministro con objetivo para uso en método de diagnóstico un *in vivo* de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el polipéptido detectable es una proteína autofluorescente, preferiblemente una proteína fluorescente verde o cualquier variante estructural de la misma con un espectro de adsorción y/o emisión alterada.

Como se ha descrito anteriormente, el sistema de suministro con objetivo de la presente invención tiene una idoneidad particular para administrar marcadores en áreas hipóxicas.

40 En el sistema de suministro con objetivo aislado de la presente invención, los enlaces entre las proteínas fijadoras de hierro y el marcador comprendido en el complejo son covalentes y/o no covalentes; o el marcador comprendido en el complejo queda atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro, preferiblemente ferritina o multímeros de la misma, en ausencia de un enlace covalente o no covalente. En una realización, el acoplamiento covalente y/o no covalente es indirecto a través de un conector o espaciador. Si se desea la formación de enlaces covalentes, se usan grupos tiol, amino o carboxilo relevantes de las proteínas fijadoras de hierro para acoplar covalentemente marcadores
45 directa o indirectamente a la una o más proteínas fijadoras de hierro. También se prevé que en el complejo estén comprendidos diferentes marcadores. Por ejemplo, un tipo de marcador puede estar unido a una proteína fijadora de hierro (unido de forma no covalente), mientras que otro tipo de marcador está encapsulado. Este enfoque utiliza diferentes velocidades de liberación de los marcadores de la proteína fijadora de hierro una vez entregados al tejido y/o células objetivo.

50 Se divulga un método de preparación del sistema de suministro con objetivo aislado de la presente invención que comprende las etapas de

a) proporcionar proteína fijadora de hierro purificada como se define anteriormente;

b) unir covalente o no covalentemente un marcador y/o encapsular un marcador en una proteína fijadora de hierro;

c) proporcionar una célula de leucocitos CD45+ como se definió anteriormente; y

d1) incubar la célula de leucocitos CD45+ en presencia del complejo de la proteína fijadora de hierro y el marcador producido en la etapa b) hasta que la célula de leucocitos CD45+ esté al menos parcialmente, preferiblemente completamente cargada con el complejo de la proteína fijadora de hierro y el marcador producido en la etapa b); y/o

5 d2) incubar célula de leucocitos CD45+ en presencia del marcador hasta que la célula de leucocitos CD45+ esté marcada al menos parcialmente con el marcador.

Se divulga además el sistema de suministro con objetivo aislado que se puede producir mediante el método descrito anteriormente.

10 La formación del aducto entre la proteína y el marcador puede ser una unión de marcador no covalente a la proteína objetivo y se puede describir de la siguiente manera: En el caso de la ferritina, los marcadores normalmente se pueden encapsular dentro de la cavidad interna (confinamiento físico) aprovechando las propiedades de asociación y disociación de la propia macromolécula de ferritina. Las moléculas marcadoras se mantienen en su lugar mediante interacciones no covalentes con residuos de aminoácidos dentro de la superficie interna de la cavidad. Las macromoléculas de hemoglobina también ofrecen la posibilidad de unión no covalente de moléculas marcadoras seleccionadas que pueden alojarse dentro de la bolsa de unión al hemo de la propia hemoglobina. El hemo puede ser desplazado por el bolsillo y reemplazado por marcadores con un perfil de hidrofobicidad apropiado. En un aspecto adicional, todas las proteínas consideradas en la presente invención pueden unirse covalentemente a marcadores modificados por restos enlazadores activos específicos que reaccionan con grupos tiol o amino de la propia proteína. Como tales, las ferritinas o la hemoglobina pueden unirse a marcadores reactivos con tiol de cisteína que llevan un conector escindible basado en péptidos (por ejemplo, secuencia de valina-citrulina sensible a catepsina y espaciador de paraaminobencilcarbamato). El conector basado en péptidos une la proteína al marcador de manera estable para que el marcador no se libere fácilmente de la proteína en condiciones fisiológicas y ayuda a prevenir la toxicidad y/o la fuga a células sanas y garantiza la especificidad del marcador. El aducto marcador de proteína así generado es capaz de unirse a los tipos de receptores seleccionados, es decir, CD163 para hemoglobina y TfR para ferritina o transferrina, respectivamente. Una vez unido, el aducto marcador de proteína se internaliza mediante endocitosis y, por lo tanto, es ocupado selectivamente por las células objetivo. La vesícula que contiene el marcador se fusiona con lisosomas y cisteína proteasas lisosomales, particularmente la catepsina B, comienza a descomponer el conector valina-citrulina y el marcador ya no está unido al anticuerpo y se libera directamente en el entorno del tumor.

Alternativamente, se utiliza un marcador que lleva un conector que se une específicamente a residuos de lisina generando un complejo covalente con ferritina, hemoglobina o transferrina en una reacción.

30 El término "carga completa" se usa en el contexto de la presente invención para referirse a la cantidad máxima de proteína fijadora de hierro, preferiblemente ferritina, complejada con un marcador que puede ser ocupado por la célula de leucocitos CD45+, preferiblemente macrófagos, más preferiblemente macrófagos activados.

35 Dado que el sistema de suministro con objetivo aislado comprende células vivas, se prefiere que los portadores y excipientes comprendidos en la composición de diagnóstico de acuerdo con el primer aspecto de la invención se elijan de tal manera que mantengan vivas las células.

"Farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de EE.UU u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

40 El término "portador", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia farmacológicamente inactiva tal como, pero no limitado a, un diluyente, excipiente, tensioactivos, estabilizadores, soluciones tampón fisiológicas o vehículos con los que se administra el marcador. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos o sólidos. Los portadores líquidos incluyen, pero no se limitan a, líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluidos, pero no se limitan a, aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Una solución salina es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se divulgan ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

50 Los "excipientes" farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

Los "tensioactivos" incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos tales como, pero no se limitan a, desoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio, Triton X-100 y polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65 y polisorbato 80.

55 Los "estabilizadores" incluyen, pero no se limitan a, manitol, sacarosa, trehalosa, albúmina, así como antagonistas de proteasa y/o nucleasa.

“Solución tampón fisiológica” incluye, pero no se limitan a, solución de cloruro de sodio, agua desmineralizada, así como soluciones tampón orgánicas o inorgánicas adecuadas tales como, pero no se limitan a, tampón fosfato, tampón citrato, tampón tris (tris(hidroximetil)aminometano), tampón HEPES (ácido [4 (2 hidroxietil)piperazino]etanosulfónico) o tampón MOPS (ácido 3 morfolino-1 propanosulfónico). La elección del respectivo tampón depende en general de la molaridad deseada del tampón. Los tampones de fosfato son adecuados, por ejemplo, para soluciones inyectables y para perfusión.

En realizaciones preferidas del sistema de suministro con objetivo aislado para uso en un método de diagnóstico *in vivo* del primer aspecto de la presente invención, el sistema de suministro con objetivo aislado es para uso en el diagnóstico de tumores, preferiblemente un tumor sólido y/o sus metástasis, preferiblemente cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de colon o sus metástasis, o un tumor que tiene áreas hipóxicas, enfermedad inflamatoria o áreas isquémicas, en particular en heridas de la piel, otras heridas o después de un infarto de órganos (corazón) o retina isquémica.

El sistema de suministro con objetivo de acuerdo con la presente invención permite la administración al tumor de los marcadores, preferiblemente agentes de contraste, que normalmente no podrían llegar al tumor (por ejemplo, debido a problemas de solubilidad o falta de vasculatura). También permite el suministro de marcadores, preferiblemente agentes de contraste, a los tumores hipóxicos o a las áreas hipóxicas del tumor. Este sistema también proporciona el suministro de un agente de contraste a cualquier área dentro de un organismo sometida a condiciones hipóxicas, por ejemplo durante incidentes isquémicos o que está experimentando un proceso inflamatorio.

Como se mencionó anteriormente, la presente invención también divulga un método para el suministro objetivo de marcadores a la masa tumoral. Este método comprende la preparación de leucocitos CD45+ que permite la captación altamente eficiente de proteínas fijadoras de hierro r (ferritina, hemoglobina y/o transferrina) por parte de los macrófagos, en donde dicha ferritina, hemoglobina y/o transferrina llevan un marcador, preferiblemente un agente de contraste, y un objetivo tumoral.

Además, la presente invención permite dirigir radiomarcadores a la masa tumoral. Estos métodos comprenden leucocitos CD45+, preferiblemente macrófagos activados cargados con ferritina encapsulada o decorada con el agente de contraste para imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, ferrihidrita) o imágenes por PET/SPECT (por ejemplo, radioisótopos emisores de radiación α o β , que también emiten una cantidad dañina para las células de radiación γ , preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en lutecio-177, iterbio-90, yodo-131, samario-153, fósforo-32, cesio-131, paladio-103, radio-223, yodo-125 y boro-10 o una cantidad de radiación α que daña las células, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en actinio-225, bismuto-213, plomo-212 y polonio-212).

La presente invención explota leucocitos CD45+, preferiblemente macrófagos activados cargados con proteínas fijadoras de hierro unidas con un marcador, preferiblemente agente de contraste como sistema de suministro para dirigirse al tumor y visualizarse mediante métodos de obtención de imágenes (por ejemplo, PET). Las dificultades en su detección mediante métodos de imagen están relacionadas principalmente con una penetración alterada de los agentes de contraste en las áreas hipóxicas que se observa principalmente en los tumores sólidos, especialmente en sus micrometástasis debido a una vasculatura deficiente. Sin embargo, estas regiones avasculares atraen leucocitos CD45+, preferiblemente macrófagos activados, para migrar incluso en áreas alejadas de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, ellos constituyen un sistema de entrega de partículas a la masa tumoral. Un ejemplo prometedor de tales partículas es la proteína fijadora de hierro. Sin embargo, cuando se usan como agentes únicos, no llegan a regiones hipóxicas, al igual que otros compuestos, y se acumulan en otros órganos.

Los presentes inventores vincularon marcadores o isótopos a la hemoglobina o la transferrina utilizando métodos químicos y las cargaron en leucocitos CD45+ (monocitos, macrófagos, linfocitos y/o granulocitos), preferiblemente macrófagos activados que tratan las células con una solución de proteína fijadora de hierro como se describe en los ejemplos. Los inventores observaron que tras la administración al animal, leucocitos CD45+ cargados, preferiblemente macrófagos activados, migran a los sitios hipóxicos del tumor y liberan proteínas de unión al hierro con marcadores encapsulados en las células cancerosas. Este método permite la administración precisa de los marcadores en el sitio del tumor (especialmente en las regiones hipóxicas), evitando su acumulación en otros órganos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El panel (A) muestra un fragmento activo mínimo de una secuencia de aminoácidos consenso entre cadenas h de ferritina de mamíferos y dos secuencias consenso de longitud completa basadas en varias cadenas h de ferritina de mamíferos (ver SEQ ID NO: 1, 2 y 7, respectivamente) así como una secuencia de aminoácidos mínima y completa de ratón (SEQ ID NO: 3 y 4) y cadena h de ferritina humana (SEQ ID NO: 5 y 6). El panel (B) muestra un fragmento activo mínimo de una secuencia de aminoácidos consenso entre cadenas L de ferritina de mamíferos y dos secuencias consenso de longitud completa basadas en varias cadenas L de ferritina de mamíferos (ver SEQ ID NO: 8, 9 y 14, respectivamente) así como una secuencia de aminoácidos mínima y completa de ratón (SEQ ID NO: 10 y 11) y cadena L de ferritina humano (SEQ ID NO: 12 y 13). El panel (C) muestra un fragmento activo mínimo de una secuencia de aminoácidos consenso entre cadenas alfa de hemoglobina de mamíferos y una secuencia consenso de longitud completa basada en varias cadenas alfa de hemoglobina de mamíferos (ver SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente) así como también una secuencia de aminoácidos de longitud mínima y completa de la cadena de

5 alfa hemoglobina humana (SEQ ID NO: 17 y 18). El panel (D) muestra un fragmento activo mínimo de una secuencia de aminoácidos consenso entre cadenas beta de hemoglobina de mamíferos y secuencias consenso de longitud completa basadas en varias cadenas beta de hemoglobina de mamíferos (ver SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente) así como una secuencia de aminoácidos mínima y completa de cadena de beta hemoglobina humana (SEQ ID NO: 21 y 22). El panel (E) muestra un fragmento activo mínimo N- y C-terminal de una secuencia de aminoácidos de consenso entre transferrinas de mamíferos (SEQ ID NO: 23 y 24) y secuencias consenso de longitud completa basadas en varias transferrinas de mamíferos (SEQ ID NO: 25) así como un fragmento activo mínimo N- y C-terminal de una transferrina humana (SEQ ID NO: 26 y 27) y secuencia de aminoácidos de longitud completa de transferrina humana (SEQ ID NO: 28). En las secuencias consenso X indica una posición que es variable y representa cualquier aminoácido natural. Preferiblemente, en cada caso X, independientemente de otro X, representa el aminoácido presente en la proteína humana.

Figura 2: Muestra macrófagos dentro de la masa tumoral del ratón (teñida con TRITC antes de la inyección, cargado con ferritina decorada con FITC).

15 Figura 3: Muestra una imagen de microscopía confocal de un ratón con tejido tumoral inyectado con células de cáncer de mama y macrófagos i.v. dados cargados con ferritina FITC (astérix): se observa claramente, no sólo en los macrófagos sino también en las células cancerosas, que la ferritina-FITC se disemina por toda la masa tumoral.

Figura 4: Muestra imágenes de resonancia magnética de un tumor mamario de ratón. El ratón fue tratado (en el momento 0 h) con macrófagos (inyección i.v.) cargados con ferritina Fh. Luego observamos un aumento en el diámetro de los vasos sanguíneos (flecha) llenos de macrófagos inyectados (lo que proporciona una reducción significativa de la señal T2) y los macrófagos posteriores se extendieron al tejido (patrón en forma de mancha; flechas). Estos cambios (en los mismos momentos) se observaron en todos los ratones examinados.

Figura 5: Muestra la captación de ferritina, hemoglobina y transferrina por los macrófagos, la captación de ferritina y hemoglobina por los monocitos y la captación de ferritina por los linfocitos y granulocitos.

Figura 6: Muestra la estabilidad del almacenamiento de ferritina por parte de los macrófagos.

25 Figura 7: Muestra la imagen de microscopía de dos fotones que muestra el tumor de un ratón que recibió macrófagos premarcados (antes de la administración) que contienen ferritina-FITC.

Figura 8: Muestra imágenes de todo el cuerpo de ratones que recibieron macrófagos marcados por vía intravenosa, mostrando su acumulación en el sitio del tumor y su distribución en otros órganos.

30 Figura 9: Muestra la migración de macrófagos al tejido hipóxico, una sección transversal del tumor de un ratón al que se le administraron macrófagos premarcados por vía intravenosa, las áreas hipóxicas del tumor se visualizan con un marcador de hipoxia: pimonidazolona.

Figura 10: Muestra la señal registrada por PET a partir de un análisis de cuerpo entero de ratones con cáncer metastásico 4T1. Los ratones recibieron macrófagos por vía intravenosa cargados con 18F-FDG. La acumulación de señales aumenta en los pulmones de ratones con micrometástasis (confirmada mediante examen patológico). Los ratones que recibieron 18F-FDG simple o los ratones sin cáncer 4T1 tuvieron una señal PET más baja.

Sección de ejemplo

Ejemplo 1 - Activación de macrófagos

40 Los macrófagos para uso de acuerdo con la presente invención se obtuvieron, diferenciaron y activaron de la siguiente manera. Para activar los macrófagos, estos se obtienen en primer lugar a partir de precursores de la médula ósea (por ejemplo, consulte el artículo: Weischenfeld y Porse, 2008, Protocolo CSH, doi. 10.1101/pdb.prot.5080) o monocitos sanguíneos. Alternativamente, se pueden obtener del peritoneo. Los métodos de aislamiento, cultivo, diferenciación y polarización/activación de macrófagos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, ellos han sido descritos en detalle por Murray et al. (Immunity, 2014, 41(1):14-20).

45 En esta realización práctica de la invención, los macrófagos derivados de la médula ósea se obtuvieron de ratones BALB/c o C57B1/6; sin embargo, los macrófagos derivados de monocitos de sangre canina o líneas celulares de macrófagos disponibles comercialmente (células de ratón de linaje de monocitos-macrófagos: RAW 264.7, J744, células humanas: THP-1, U937 o células caninas DH82).

50 En breve, dichos macrófagos derivados de la médula ósea se siembran en una placa de Petri de plástico en 5 ml de medio (3 ml de células por placa): DMEM: F12 + glutamina/glutamax + 10 % de FBS + penicilina/estreptomicina y 20 % de medio condicionado L929 o M-CSF (50 ng/ml). En los cinco días siguientes, el medio se complementa con factor de crecimiento y uno de los compuestos activadores o sus combinaciones como un cóctel de citocinas.

Alternativamente, los macrófagos se han cultivado en "M1/M2 Macrophage Generation Medium" (Promocell) o un medio equivalente disponible comercialmente o de fabricación propia que contiene todas las citocinas e interleucinas necesarias para considerarlos activados.

5 Para obtener macrófagos de los monocitos sanguíneos, se centrifuga sangre fresca (que no tenga más de 12 horas) usando el sistema Histopaque 1077 o equivalente y glóbulos blancos (o alternativamente, solo glóbulos blancos recolectados del banco de sangre) en una cantidad adecuada de medio de fijación de monocitos precalentado (o equivalente, por ejemplo, DMEM/RPMI suplementado con M-CSF), por ejemplo, 15 ml de medio por matraz T-75. La densidad de siembra debe ser de 1-2 millones/cm² para células mononucleares con un contenido de monocitos ≥ 25 % y 1.5-3 millones/cm² para un contenido de monocitos < 25 %. Luego, las células se incuban durante 1 a 1.5 horas al 5 % de CO₂ y 37 °C en la incubadora sin ninguna manipulación adicional.

10 Después de la unión de las células, se lavan al menos dos veces, y luego se añade a las células una cantidad adecuada de "medio de generación de macrófagos M1 o M2 DXF" completo (por ejemplo, 20 ml por matraz T-75) y las células se incuban durante 6 días a 37 °C y 5 % CO₂ sin cambio de medio. Para activar los macrófagos, todo el medio debe reemplazarse con medio complementado con un compuesto activador.

15 Los compuestos activadores utilizados en esta invención (para células derivadas de médula ósea o para activar células de líneas celulares de monocitos-macrófagos) son los siguientes: IL-4 (20 ng/ml), IFN-γ (al menos 20 ng/ml), LPS (al menos 10 ng/ml), IL-13 (al menos 20 ng/ml), IL-10 (al menos 20 ng/ml), dexametasona (al menos 20 μg/ml), oxLDL (al menos 20 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), TGF-β (20 ng/ml), cortisol (150-300 ng/ml) o sus combinaciones como un cóctel de citocinas. Para obtener macrófagos inactivados no se ha añadido el compuesto activador.

20 La inversión de la polarización/activación de los macrófagos (desde la activación clásica hasta la activación alternativa) se puede lograr, por ejemplo, mediante cultivo de macrófagos en las citoquinas apropiadas enumeradas anteriormente durante al menos 48 horas.

20 Ejemplo 2 - Aislamiento de monocitos

Para obtener monocitos en esta realización práctica de la invención, se obtuvieron monocitos derivados de médula ósea o derivados de bazo de ratón BALB/c o C57B1/6, sin embargo, se usaron monocitos de sangre canina o líneas celulares de monocitos disponibles comercialmente (células de ratón de linaje de monocitos-macrófagos): RAW 264.7, J744, humano: línea celular de THP-1, U937 o DH82 de canino).

25 Para obtener monocitos sanguíneos, se centrifuga sangre fresca (que no tenga más de 12 horas) utilizando el sistema Histopaque 1077 o equivalente y se siembran glóbulos blancos en una cantidad adecuada de medio de fijación de monocitos precalentado (o equivalente, por ejemplo, DMEM/RPMI suplementado con 20 ng/ml de M-CSF), por ejemplo, 15 ml de medio por matraz T-75. Alternativamente, sólo se pueden utilizar glóbulos blancos extraídos del banco de sangre (capa de leucocitos). La densidad de siembra debe ser de 1 a 2 millones/cm² para células mononucleares con un contenido de monocitos ≥ 25 % y de 1.5 a 3 millones/cm² para un contenido de monocitos < 25 %. Luego, las células se incuban durante 1 a 1.5 horas al 5 % de CO₂ y 37 °C en la incubadora sin ninguna manipulación adicional. Después de la unión de las células, se lavan al menos dos veces y las células adherentes se consideran monocitos.

35 Para obtener monocitos derivados de la médula ósea, en esta realización práctica de la invención se obtuvieron macrófagos derivados de la médula ósea de ratón BALB/c o C57B1/6. En breve, dichos precursores derivados de la médula ósea se siembran en una placa de Petri de plástico en 5 ml de medio (3 ml de células por placa): DMEM: F12 + glutamina/glutamax + 10 % FBS + penicilina/estreptomicina y 20 % de medio condicionado L929 o 20 ng/ml de M-CSF. Dos días después se añaden 5 ml de medio estándar. Luego, después de dos días, se añaden 0.5 ml/placa de medio acondicionado L929. Las células adherentes se consideran monocitos.

40 Para obtener monocitos derivados del bazo, en esta realización práctica de la invención, el bazo se disocia mecánicamente para obtener una suspensión de células individuales y se pasa a través del filtro celular de 70 μm. Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Después de la lisis de los eritrocitos, los monocitos se aislaron usando purificación con perlas magnéticas, por ejemplo Protocolo del kit de enriquecimiento de monocitos de ratón EasySep e imán adecuado.

45 Para obtener mejores efectos de su carga proteica y de su migración antes de su uso, pueden tratarse previamente con estímulos de activación de macrófagos: IL-4 (20 ng/ml), IFN-γ (al menos 20 ng/ml), LPS (al menos 10 ng/ml), IL-13 (al menos 20 ng/ml), IL-10 (al menos 20 ng/ml), dexametasona (al menos 20 μg/ml), oxLDL (al menos 20 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml), TGF-β (20 ng/ml), cortisol (150-300 ng/ml), o sus combinaciones como un cóctel de citoquinas.

Ejemplo 3 - Aislamiento de granulocitos

50 Para obtener células de granulocitos a partir de la sangre, se diluyeron 9 partes de sangre con 1 parte de tampón ACD (que contiene d-glucosa 0.17 M, ácido cítrico 0.10 M, citrato trisódico 0.11 M). La sangre de esta etapa se diluyó aún más con PBS en una proporción de 1:1 y se centrifugó. Después de eliminar el plasma y la capa de leucocitos, las células restantes se mezclaron con PBS hasta el 80 % del volumen original de la primera etapa (ACD-sangre) y luego se diluyeron con agua destilada fría en una proporción de 4:12. Luego se añadieron 6 partes de una solución de NaCl al 2.7 % y se centrifugaron. Después de eliminar las células sobrenadantes, se resuspendieron en medio RPMI-1640. Estas células fueron consideradas granulocitos.

Ejemplo 4 - Aislamiento de linfocitos

Para obtener linfocitos derivados del bazo, en esta realización práctica de la invención, el bazo se ha disociado mecánicamente para obtener una suspensión de células individuales y se ha hecho pasar a través del filtro celular de 70 μm . Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Después de la lisis de los eritrocitos, los linfocitos se aislaron utilizando purificación con perlas magnéticas, por ejemplo, el protocolo del kit de enriquecimiento CD4⁺ de ratón EasySep e imán adecuado.

Ejemplo 5 - Preparación de complejos de ferritina

Para incorporar ferritinas con fármacos anticancerígenos (por ejemplo, fármacos clásicos como ciclofosfamida, cloramubicilo, melfalán, bendamustina, banoxantrona o profármacos activados por hipoxia como TH-302) o con "agentes de contraste de imágenes" (por ejemplo, ferrihidruro o isótopo), las ferritinas deben ser preparadas antes del tratamiento con macrófagos. En breve, proteínas de ratón recombinantes de acuerdo con SEQ ID NO: 4 (Figura 1) se obtienen de la siguiente manera. El vector de expresión pET-22b que contiene un gen sintético que codifica la proteína ferritina de SEQ ID NO: 4 se transformó en *E. coli* BL21 (DE3). El cultivo de *E. coli* se cultivó a 37 °C a OD600 0.6 en 1 l de caldo Luria-Bertani (LB) al que se añadió ampicilina (100 mg/l). La expresión de proteínas se indujo mediante la adición de isopropil tio-b-D-galactósido (IPTG) 1 mm y el cultivo se incubó durante la noche. Las células se recogieron mediante centrifugación (15000 g durante 15 minutos) y se suspendieron en Hepes 20 mm (pH 7.5), NaCl 150 mm, ADNasa 0.1 mg/ml, mgCh 10 mm y se rompieron mediante sonicación. El lisado se centrifugó a 15000 g durante 30 min y el sobrenadante se trató durante 10 min a 50 °C, se centrifugó para eliminar las proteínas desnaturalizadas y luego a 70 °C durante 10 min y se centrifugó nuevamente. Al sobrenadante se le añadió 30 % (NH₄)₂SO₄ a 4 °C agitando durante 1 h y centrifugado a 15000 g durante 30 min. Al sobrenadante se le añadió 70 % (NH₄)₂SO₄ a 4 °C agitando durante 1 h y centrifugado a 15000 g durante 30 min. El gránulo se resuspendió en Hepes 20 mm (pH 7.5), NaCl 150 mm y se dializó durante la noche a 4 °C frente al mismo tampón. La proteína se cargó en una columna de filtración en gel HILOAD 26/600 SUPERDEX 200 (GE-Healthcare) y luego se filtró de forma estéril y se almacenó a 4 °C. (Figura 9) la concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 21000 M⁻¹ m⁻¹ y mediante ensayo de Bradford midiendo la absorbancia a 595 nm.

Dichas ferritinas incluyen homopolímeros H y/o L de proteínas de ferritina de mamíferos recombinantes.

Las ferritinas, obtenidas como se describió anteriormente, se purifican mediante métodos estándar para obtener un producto de grado preclínico libre de endotoxinas (ver, por ejemplo: Ceci et al. 2011, *Extremophiles* 15(3):431-439; Vanucci et al. 2012, *Int J Nanomed* 7:1489-1509). En breve, la ferritina conservada estéril en una solución de almacenamiento que contiene Hepes 20 mm, pH 7.5, se diluye hasta una concentración final de 4 μM en 24 unidades en una solución ácida (pH final < 3.0) o, alternativamente, a valores de pH muy básicos (pH > 9.5) (ver por ejemplo Pontillo et al., 2016), permitiendo así la disociación del multímero. Los fármacos se disuelven en concentraciones muy altas en el disolvente apropiado y luego se añade un pequeño volumen a la solución de ferritina con un exceso de 200 molar. Luego, el PH se lleva a la neutralidad mediante la adición de cantidades apropiadas de soluciones de NaOH/HCl para permitir la reconstitución del multímero. Los métodos experimentales actuales indican que tres/cuatro lavados usando PBS (etapas de concentración) en concentradores de corte de 100 kDa permiten una eliminación rápida y completa tanto de los cosolventes como de los fármacos no encapsulados y la recuperación completa de las nanojaulas de ferritina cargadas con el fármaco. A continuación, el complejo ferritina-fármaco así obtenido se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizó.

Dependiendo de la elección del codisolvente y de las propiedades químicas intrínsecas de la molécula del fármaco, se puede estimar que se pueden atrapar/adsorber hasta 150-180 moléculas del fármaco dentro de la jaula de ferritina de 24 unidades.

Los marcadores también pueden acoplarse covalentemente a cadenas laterales de aminoácidos de ferritina (lisinas o cisteínas) mediante la elección apropiada de marcadores activados con fenilhidrazona, succinimida o maleimida. En consecuencia, i) el derivado de fenilhidrazona puede romper y liberar el marcador de la superficie de ferritina, ii) los derivados unidos a lisina pueden volverse activos después de la degradación completa de la proteína en aminoácidos o iii) el derivado unido a cisteína puede liberarse dentro de la célula mediante hidrólisis reductora del enlace maleimida tioéter.

Ejemplo 6 - Preparación de complejo de hemoglobina-compuesto

La hemoglobina humana se prepara a partir de glóbulos rojos frescos como se divulga en Rossi-Fanelli et al. (*Archives of biochemistry and biophysics* 77:478-492, 1958). En breve, la sangre heparinizada, obtenida de donantes sanos, se centrifugó a 1600 rpm durante 30 minutos (4 °C) para sedimentar los RBC. La capa de leucocitos se eliminó con precisión mediante aspiración con aguja en la superficie del gránulo. Se descartó el sobrenadante de plasma y el sedimento de eritrocitos se lavó tres veces resuspendiendo los RBC en solución salina isotónica al 0.9 % y centrifugando a 1600 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Después de la etapa final de lavado con solución salina y centrifugación, el gránulo de RBC se resuspendió en agua destilada tamponada a pH 7.2 con tampón de fosfato de potasio 5 mm (PB, pH = 7.2) y se dejó lisar a 4 °C durante la noche con agitación suave. Posteriormente, el lisado RBC dializado se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se cargó directamente en un

sistema ÄKTA Explorer equipado con una columna XK 26/40 empaquetada con resina Q-sepharose XL (GE Healthcare) a temperatura ambiente. Las columnas se equilibraron con tampón A (Tris-HCl 20 mM, pH = 8.2) a un caudal de 12 ml/min y se lavaron tres veces con el mismo tampón. Se generó una elución en gradiente lineal cambiando del 100 % de tampón A a 75 % de tampón B (Tris-HCl 20 mM, más NaCl 0.2 M, pH 8.20) seguido de un gradiente escalonado de 100 % de tampón B. Tras la elución, se utilizó un recolector de fracciones para recolectar las fracciones de proteínas. La proteína así obtenida se analizó mediante SDS page y se almacenó congelada a -80 °C.

Hemoglobina humana (SEQ ID NO: 18 o 22, ver Figura 1) pueden unirse fácilmente de forma covalente a conjugados de fármacos apropiados, albergar moléculas de fármaco hidrófobas dentro de la bolsa de unión del hemo o incluso transportar pequeñas moléculas citotóxicas unidas al hierro del hemo. La Hb puede modificarse fácilmente mediante la unión selectiva del conjugado farmacológico apropiado al residuo de cisteína en la posición 93 de las cadenas beta, la única cisteína titulable en la superficie de la proteína. La solución de apoproteína debe mantenerse en un baño de hielo durante el proceso de reconstitución. Un exceso molar de 1.5 veces de CuT-CPP (Cu-TCPP 4,4',4'',4'''-(Porfina-5,10,15,20-tetra)tetraakis(ácido benzoico) - Cu⁶⁷) en NaOH 0.1 M se debe agregar gota a gota a la solución de apoglobina en tampón KPi 0.2 M a pH 7.0, agitar rápidamente a temperatura ambiente y luego volver a colocarlo en un baño de hielo durante 30 minutos. Luego, la solución de proteínas debe filtrarse en un filtro de jeringa antes de su uso.

Ejemplo 7 - Preparación de complejo transferrina-compuesto

El suero se obtuvo de un donante sano y se añadió un exceso de hierro en presencia de iones citrato como quelante y bicarbonato, lo que facilita la unión del hierro a la transferrina. La mezcla de reacción contenía 6.5 mg de bicarbonato de sodio y 153.16 de citrato férrico en pH=8, 4 °C, 1 h por 100 ml de suero. Posteriormente, la albúmina se precipitó con Rivanol (4 %) añadiendo la solución de alcohol a la muestra de suero en una relación de 3.5 V/V a 4 °C y pH = 9.4 durante 2 h. Luego, la solución se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min y finalmente se filtró mediante un filtro en un filtro de jeringa de 0.8 µm. Posteriormente se eliminó el exceso de rivanol mediante filtración en gel en una columna Sephadex G-25 en sulfato de amonio 0.025 M. Posteriormente se llevó a cabo una primera precipitación con sulfato de amonio saturado al 50 % a pH = 6.5 seguido de una centrifugación a 3000 rpm durante 10 min (eliminación de inmunoglobulinas). A continuación se llevó a cabo una segunda precipitación con sulfato de amonio saturado al 80 %, permitiendo así la recuperación de la transferrina del precipitado. Luego se disolvió el precipitado sólido en tampón Tris HCl 0.06 M, pH = 8, que contenía NaCl 1 M. La solución se dializó en el mismo tampón para permitir la eliminación completa del sulfato de amonio. Luego se concentró la solución de proteína con un concentrador centrífugo Centricon PM50 hasta 10-15 mg/ml (estimado por el método de Bradford) y se cargó en una columna de filtración en gel Sephadex G-100 (2,4 x 80 cm) equilibrada en NaCl 1 M, caudal de 15 ml/h. Se estimó que la transferrina así obtenida tenía una pureza del 88-90 % mediante SDS page. Luego se utilizó cromatografía de intercambio iónico mediante intercambiador aniónico DEAE Sephadex A-50 como etapa de pulido final. La muestra de transferrina se cargó en la columna equilibrada con Tris HCl 0.06 M a pH = 8 y se eluyó mediante un gradiente de concentración lineal con tampón de elución, Tris HCl 0.3 M, pH = 8. La pureza de la proteína fue superior al 98 % con un rendimiento de aproximadamente 150 mg por 100 ml de suero.

Holotransferrina humana, (SEQ ID NO: 28, Figura 1), de manera similar a la hemoglobina, se puede unir fácilmente de forma covalente a conjugados marcadores apropiados. La solución de apoproteína debe mantenerse en un baño de hielo durante el proceso de reconstitución. Un exceso molar de 1.5 veces de CuT-CPP (Cu-TCPP 4,4',4'',4'''-(Porfina-5,10,15,20-tetra)tetraakis(ácido benzoico) - Cu⁶⁷) en NaOH 0.1 M se debe agregar gota a gota a la solución de apoglobina en tampón KPi 0.2 M a pH 7.0, agitar rápidamente a temperatura ambiente y luego volver a colocarlo en un baño de hielo durante 30 minutos. Luego, la solución de proteínas debe filtrarse en un filtro de jeringa antes de su uso.

Ejemplo 8 - Obtención de células cargadas con ferritina

Las células obtenidas se incuban en solución de ferritina durante un tiempo y en una concentración suficiente para garantizar la relación adecuada de ferritina/célula para su carga completa y también para garantizar un contenido de contraste adecuado para obtener imágenes adecuadas. El tiempo y la concentración pueden variar dependiendo de la cantidad de moléculas encapsuladas/adsorbidas en la jaula de ferritina, el estado de activación celular, la condición y la cantidad de su administración prevista.

Por ejemplo, para garantizar una carga adecuada con ferritinas, las células se incuban durante 1 a 4 horas en una solución de ferritina de 0.2 mg/ml en condiciones de cultivo estándar. El rango de concentración de ferritina puede variar al menos entre 0.01 y 4 mg/ml, así como el tiempo de incubación (5 minutos - 6 horas o más). Al ajustar el tiempo y la concentración de la carga de ferritina a las células, se debe tener en cuenta la influencia de la ferritina y las condiciones de tratamiento en la viabilidad celular. Las células obtenidas como se indicó anteriormente absorben ferritinas muy fácilmente en un tiempo relativamente corto (en minutos; Figura 5). Una vez que absorben ferritinas, ellas no la liberan al medio de cultivo (Figura 6).

Sin embargo, el experto en la técnica puede reajustar las condiciones anteriores y optimizar el protocolo para sus propios fines en el propio laboratorio.

Ejemplo 9 - Obtención de células cargadas de hemoglobina

Las células obtenidas se incuban en solución de hemoglobina durante un tiempo y en una concentración suficiente para garantizar la proporción adecuada de hemoglobina/célula para su carga completa y también para garantizar un contenido de contraste adecuado para obtener imágenes adecuadas. El tiempo y la concentración pueden variar dependiendo de la cantidad de moléculas unidas a la molécula de hemoglobina, el estado de activación celular, la condición y la cantidad de su administración prevista.

Por ejemplo, para asegurar una carga adecuada de hemoglobinas, las células se incuban durante 1 a 4 horas en una solución de hemoglobina de 0.1 mg/ml en condiciones de cultivo estándar. El marco de concentración de hemoglobina puede variar al menos entre 0.01 y 0.2 mg/ml así como el tiempo de incubación (5 minutos - 4 horas o más). Al ajustar el tiempo y la concentración de la carga de hemoglobina a las células, se debe tener en cuenta la influencia de la ferritina y las condiciones del tratamiento en la viabilidad celular. Las células obtenidas como se indicó anteriormente absorben muy fácilmente hemoglobinas en un tiempo relativamente corto (en minutos; Figura 5).

Sin embargo, el experto en la técnica puede reajustar las condiciones anteriores y optimizar el protocolo para sus propios fines en el propio laboratorio.

Ejemplo 10 - Obtención de células cargadas con transferrina

Las células obtenidas se incuban en solución de transferrina durante un tiempo y a una concentración suficiente para garantizar la proporción adecuada de transferrina/célula para su carga completa y también para garantizar un contenido de contraste adecuado para obtener imágenes adecuadas. El tiempo y la concentración pueden variar dependiendo del número de moléculas unidas a la molécula de transferrina, el estado de activación celular, la condición y el número de su administración prevista.

Por ejemplo, para asegurar una carga adecuada con transferrinas, las células se incuban durante 1 a 4 horas en una solución de transferrina de 0.1 mg/ml en condiciones de cultivo estándar. El marco de concentración de transferrina puede variar al menos entre 0.01 y 0.2 mg/ml así como el tiempo de incubación (5 minutos - 4 horas o más). Al ajustar el tiempo y la concentración de la carga de transferrina a las células, se debe tener en cuenta la influencia de la transferrina y las condiciones de tratamiento en la viabilidad celular. Las células obtenidas como se indicó anteriormente absorben muy fácilmente la transferrina en un tiempo relativamente corto (en minutos; Figura 5).

Sin embargo, el experto en la técnica puede reajustar las condiciones anteriores y optimizar el protocolo para sus propios fines en el propio laboratorio.

Ejemplo 11 (Ejemplo de referencia) - Marcador celular con radioisótopo

En esta invención las células se marcaron con ¹⁸F-FDG para obtener imágenes en PET. Las células se separaron de la placa y se incubaron con una solución de ¹⁸F-FDG en concentración adecuada para garantizar la captación óptima de ¹⁸F-FDG por las células permitiendo su radiodetección en el lugar de su acumulación. En esta invención práctica, las células se trataron previamente con diversos cócteles de citoquinas, factores de crecimiento y otros factores que influyen en su estado de activación para mejorar su absorción del marcador y se incubaron en una solución cálida de ¹⁸F-FDG que contiene 20-60 MBq. Después de la marcación, las células se deben centrifugar y se debe eliminar el sobrenadante. Esta etapa debe repetirse hasta que no se detecte radioactividad en el sobrenadante.

Ejemplo 12 - Complejo ferritina/hemoglobina/transferrina/marcador-leucocito como herramienta útil de suministro al tumor

Los macrófagos del Ejemplo 1 se prepararon como se divulga en los Ejemplos 8, 9, 10 y 11; monocitos del Ejemplo 2 preparados como se describió en los Ejemplos 8, 9, 10 y 11, granulocitos del Ejemplo 3 preparados como se describió en los Ejemplos 8, 9, 10 y 11, y linfocitos del Ejemplo 4 preparados como se describió en los Ejemplos 8, 9, 10 y 11, transportan muy fácilmente ferritinas, hemoglobinas, transferrinas y marcadores al tumor en cantidad suficiente para ser detectados mediante sistemas de imágenes (Figuras 2, 3, 4, 7 y 8).

Ejemplo 13 - Complejo portador de leucocitos-proteína como agente útil de suministro de fármacos objetivo a regiones hipóxicas

Los macrófagos preparados como anteriormente se inyectan en la vena de la cola del animal con el tumor (el número apropiado de macrófagos debe ajustarse al tamaño del tumor, etapa de desarrollo y presencia de metástasis). Como se muestra en las Figuras 2, 3, 4, 7, 8 y 10 ellos alcanzan específicamente el tumor (después de unas horas) y también se dispersan en otros órganos de todo el animal. Además, como se muestra en la Figura 9, en el modelo hipóxico también pueden migrar a los sitios avasculares e hipóxicos.

Para obtener imágenes, se inyectaron entre 1 y 50 millones de macrófagos en la vena de la cola de un animal portador de un tumor de cáncer de mama o de colon. Antes, los macrófagos se marcaban previamente con Cell Tracker y se cargaban con ferritina-FITC (como se muestra en el Ejemplo 8). Utilizando imágenes de dos fotones de la masa tumoral 8 horas después de la administración de macrófagos, se detectó la presencia de macrófagos que portaban ferritina-

FITC (Figura 7). Su orientación específica al tumor, pero también su migración a otros órganos se demostró mediante imágenes de cuerpo animal completo (IVIS) después del premarcaje de macrófagos utilizando el tinte citoplásmico lipófilo DIR Xenolight DiR (Figura 8).

5 Ejemplo 14 - Complejo portador de leucocitos-proteína o leucocitos marcados como herramienta útil de obtención de imágenes

10 El sistema de suministro con objetivo descrito en la presente invención constituye una herramienta de obtención de imágenes muy útil. Como se presenta en las Figura 4 y 10, después de la inyección de 1-50 ml de macrófagos cargados con ferritina acoplados como se describió en el Ejemplo 8 con un agente de contraste (en este ejemplo: ferrihidrita, sin embargo, se obtienen los mismos resultados con isótopos, por ejemplo ¹²³I) o marcado con isótopo (en este caso ¹⁸F-FDG) (Figura 10) se pueden detectar fácilmente mediante MRI, PET o SPECT. En este ejemplo (Figura 4), se tomaron imágenes de ratones con tumores mamarios mediante MRI a las 3, 22 y 24 horas después de la inyección i.v. de macrófagos cargados con ferritina Fh. Como se muestra en la Figura 4, el complejo ferritina/macrófagos es una herramienta de obtención de imágenes muy útil. El ratón fue tratado (en el momento 0 h) con macrófagos. Luego se observó un aumento del diámetro de los vasos sanguíneos (flecha) llenos de macrófagos inyectados (que producen una reducción significativa de la señal T2) y los macrófagos posteriores se extendieron al tejido (patrón en forma de mancha; flechas). Estos cambios (en los mismos momentos) se observaron en todos los ratones examinados.

15 Los macrófagos también fueron marcados con ¹⁸F-FDG (1-50 ml) y se tomaron imágenes mediante PET 1 h después de la administración i.v. a los ratones portadores de tumores. Estos ratones fueron inoculados con la línea celular metastásica 4T1 3 semanas antes del experimento y se confirmaron histopatológicamente las metástasis en los pulmones, el hígado y el bazo. En la Figura 10 se ve que los macrófagos migraron a las regiones con tumores metastásicos permitiendo su visualización en la PET.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición de diagnóstico que comprende un sistema de suministro con objetivo aislado y un portador farmacéuticamente aceptable y/o excipiente(s) adecuado(s), en donde el sistema de suministro con objetivo aislado comprende una célula de leucocito CD45⁺ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, en donde el marcador
- 5 (i) se selecciona entre un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido detectable y un agente de contraste, o
- (ii) comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes; y en donde en el complejo
- 10 (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos covalentemente y/o no covalentemente, o
- (ii) el marcador queda atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o no covalente.
2. Un sistema de suministro con objetivo aislado que comprende una célula de leucocito CD45⁺ que comprende dentro de dicha célula un complejo de una o más proteínas fijadoras de hierro y un marcador, para uso en un método de diagnóstico *in vivo*;
- 15 en donde en el complejo:
- (i) la proteína fijadora de hierro y el marcador están unidos covalentemente y/o no covalentemente, o
- (ii) el marcador queda atrapado/encapsulado por la proteína fijadora de hierro o sus multímeros en ausencia de un enlace covalente o no covalente.
- 20 3. El sistema de suministro con objetivo aislado de la reivindicación 2 para uso en el diagnóstico de tumores *in vivo*.
4. El sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el tumor es un tumor sólido y/o sus metástasis, preferiblemente cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de colon o sus metástasis, o un tumor que tiene áreas hipóxicas.
- 25 5. El sistema de suministro con objetivo aislado de la reivindicación 2 para uso en el diagnóstico *in vivo* de enfermedad inflamatoria o áreas isquémicas.
6. La composición de diagnóstico de la reivindicación 1 o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la célula de leucocitos se puede producir a partir de una célula precursora hematopoyética CD34⁺ y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un monocito, un monocito diferenciado que preferiblemente es un macrófago, un linfocito y un granulocito.
- 30 7. La composición de diagnóstico de la reivindicación 6 o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde
- (i) el monocito es un monocito CD11b⁺, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un monocito CD11b⁺ CD14⁺, un monocito CD11b⁺ CD16⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD16⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ MHCII⁺, un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD115⁺, monocito CD11b⁺ CD114⁺, monocito CD11b⁺ CD116⁺, monocito CD11b⁺ CCR1⁺, monocito CD11b⁺ CCR2⁺, monocito CD11b⁺ CX3CR⁺, monocito CD11b⁺ CXR4⁺, monocito CD11b⁺ CXR6⁺ y un monocito CD11b⁺ CD14⁺ CD33⁺;
- 35 (ii) el monocito diferenciado se selecciona del grupo que consiste en un macrófago, un macrófago activado, preferiblemente un macrófago CD11b⁺, más preferiblemente un macrófago CD11b⁺ CD16⁺, macrófago CD11b⁺ CD32⁺, macrófago CD11b⁺ CD64⁺, macrófago CD11b⁺ CD68⁺, preferiblemente un macrófago CD11b⁺ CD86⁺ M1, que produce preferiblemente iNOS y/o que secreta interleucina 12 (IL-12) o preferiblemente macrófago CD11b⁺ CCR2⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD204⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD206⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD204⁺ CD206⁺ M2, macrófago CD11b⁺ complejo mayor de histocompatibilidad II⁺ (MHCII⁺) (expresión baja o alta) M2, macrófago CD11b⁺ CD200R⁺ M2, macrófago CD11b⁺ CD163⁺ M2 o macrófagos activados que producen arginasa y/o secretan interleucina 10 (IL-10); o una célula dendrítica, preferiblemente con expresión de CD11b CD11c, CD11b CD80, CD11c CD80, CD11c CD86, CD11c MHCII y CD11c CD123, preferiblemente el monocito diferenciado no es una célula espumosa Lox1⁺, CXCR7⁺ y NRF2⁺;
- 40 (iii) monocito o monocito activado que expresa al menos un receptor de quimiocina, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en CCR1, CCR2⁺, CXR4⁺ y CXR6⁺, o al menos un receptor del factor de crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en receptor del factor estimulante de colonias de macrófago (CD 115), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (CD114) y receptor del factor estimulante de colonias
- 50

de granulocitos-macrófagos (que consiste de CD116 y CD131); los monocitos de estas características son particularmente adecuados para tratar afecciones inflamatorias y cáncer;

(iv) el linfocito se selecciona del grupo que consiste en CD3⁺ y CD4⁺ o un linfocito T CD8⁺, o un linfocito B CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD21⁺, CD20⁺ CD21⁺, o CD19⁺ CD20⁺ CD21⁺; o

- 5 (v) el granulocito se selecciona del grupo que consiste en un neutrófilo, preferiblemente un neutrófilo CD66b⁺, un eosinófilo y un basófilo, preferiblemente un eosinófilo CD193⁺.

8. La composición de diagnóstico de la reivindicación 7 o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde

(a) el macrófago activado:

- 10 (i) es producible por incubación *in vitro* de un monocito o macrófago con un factor capaz de alterar marcadores de expresión en macrófagos, preferiblemente

(ia) con al menos un inductor M1,

(ib) con al menos un inductor M2,

- 15 (ic) o con un factor capaz de alterar la capacidad de los macrófagos para secretar citocinas, preferiblemente IL-10 e IL-12, quimiocinas y/o para producir iNOS, arginasa u otras enzimas inmunomoduladoras;

(ii) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: CD64, CD86, CD16, CD32, alta expresión de MHCII y/o producción de iNOS y/o IL-12;

(iii) es producible por incubación *in vitro* de un monocito o macrófago con un factor capaz de inducir la capacidad del macrófago para fagocitar;

- 20 (iv) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: CD204, CD206, CD200R; CCR2, receptor de transferrina (TfR), receptor de quimiocina motivo CXC 4 (CXCR4), CD163 y/o dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 2 (TIM-2), y/o muestran una baja expresión de MHCII;

(v) tiene la capacidad de fagocitar; y/o

- 25 (vi) es capaz de secreción de citoquinas, preferiblemente IL-12 o IL-10, o producción de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (u otros compuestos proinflamatorios), arginasa u otros compuestos inmunosupresores/antiinflamatorios;

(b) el monocito

(i) se puede producir a partir de una célula precursora CD34⁺ hematopoyética;

(ii) es producible por incubación *in vitro* de monocitos con al menos un inductor, preferiblemente un inductor M1 o M2, más preferiblemente al menos un inductor M2;

- 30 (iii) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD33⁺ y/o CD115⁺;

(iv) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CXCR4⁺, CD14⁺ y/o CD16⁺; y/o

(v) tiene la capacidad de fagocitar;

- 35 (c) el linfocito

(i) se puede obtener a partir de sangre, bazo o médula ósea o se puede producir a partir de una célula precursora CD34⁺;

(ii) es un linfocito inmunológicamente competente;

(iii) expresa receptores de células T específicos de antígeno; y/o

- 40 (iv) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes antígenos: antígeno (iva) CD3⁺ y CD4⁺ o CD8⁺ o (ivb): CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD21⁺, CD20⁺ CD21⁺, o CD19⁺ CD20⁺ CD21⁺, y preferiblemente es capaz de producir inmunoglobulinas; y/o

(d) el granulocito

- 45 (i) se puede obtener a partir de sangre, bazo o médula ósea o se puede producir a partir de una célula precursora CD34⁺;

- (ii) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes CD66b⁺ y/o CD193⁺;
- (iii) es un leucocito polimorfonuclear caracterizado por la presencia de gránulos en su citoplasma; y/o
- (iv) es caracterizado por expresión de al menos uno de los siguientes: Tfr⁺, CD163⁺, TIM-2⁺ y/o CXCR4⁺.

5 9. La composición de diagnóstico de la reivindicación 8 o el sistema de suministro con objetivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:

(a) para el macrófago activado

(i) el inductor M1 se selecciona del grupo que consiste en LPS, INF- γ , GM-CSF e infección viral y bacteriana; o

10 (ii) el inductor de M2 se selecciona del grupo que consiste en IL-4, IL-10, IL-13, complejo inmune de un antígeno y anticuerpo, IgG, gammaglobulina termoactivada, glucocorticosteroide, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, agonista de PPAR γ , factor inhibidor de leucocitos, adenosina, infección por helmintos u hongos; y/o

(b) para el monocito

(i) el inductor M1 se selecciona del grupo que consiste en LPS, INF- γ , GM-CSF o infección viral o bacteriana;

15 (ii) el inductor M2 se selecciona del grupo que consiste en IL-4, IL-10, IL-13, complejo inmune de un antígeno y anticuerpo, IgG, gammaglobulinas termoactivadas, glucocorticosteroides, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, agonista de PPAR γ , factor inhibidor de leucocitos, medio condicionado por el cáncer, células cancerosas, adenosina e infección por helmintos u hongos.

20 10. La composición de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína fijadora de hierro se selecciona del grupo que consiste en ferritina, preferiblemente ferritina de tipo pesado (H), ferritina ligera (L) y/o ferritina mitocondrial; hemoglobina, preferiblemente hemoglobina A, hemoglobina AS, hemoglobina SC, hemoglobina C, hemoglobina D, hemoglobina E, hemoglobina F, hemoglobina H; complejo hemoglobina-haptoglobina, hemopexina, transferrina; y lactoferrina.

11. La composición de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el marcador es un radioisótopo.

25 12. El sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador se selecciona entre un tinte fluorescente, un isótopo emisor de fluorescencia, un radioisótopo, un polipéptido detectable o ácido nucleico que codifica un polipéptido detectable y un agente de contraste.

30 13. El sistema de suministro con objetivo aislado para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador comprende un agente quelante que forma un complejo con cationes metálicos divalentes o trivalentes, y en donde el agente quelante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N,N'-tetraacético (DOTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), trietilentetramina (TETA), ácido iminodiacético, ácido dietilentriamina-N,N,N',N',N"-pentaacético (DTPA) y ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico (HYNIC).

35 14. La composición de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde

(a) el agente de contraste comprende un agente paramagnético, preferiblemente seleccionado entre Gd, Eu, W y Mn, o ferrihidruro;

40 (b) el isótopo emisor de radioisótopo/fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en isótopos emisores de radiación alfa, isótopos emisores de radiación gamma, isótopos emisores de electrones Auger, isótopos emisores de rayos X, isótopos fluorescentes, tales como ⁶⁵Tb, isótopos emisores de fluorescencia, tales como ¹⁸F, ⁵¹Cr, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ¹¹¹In, ^{99m}Tc, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁴⁹Pm, ¹⁷⁷Lu, ⁴⁷Sc, ¹⁴²Pr, ¹⁵⁹Gd, ²¹²Bi, ⁷²As, ⁷²Se, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁵Rh, ^{101m}¹⁵Rh, ¹¹⁹Sb, ¹²⁸Ba, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ¹⁹⁷Hg, ²¹¹At, ¹⁶⁹Eu, ²⁰³Pb, ²¹²Pb, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁹⁸Au y ¹⁹⁹Ag así como conjugados y combinaciones de los anteriores con proteínas, péptidos, inhibidores moleculares pequeños, anticuerpos

45 u otros compuestos;

y/o

(c) el polipéptido detectable es una proteína autofluorescente, preferiblemente una proteína fluorescente verde o cualquier variante estructural de la misma con un espectro de adsorción y/o emisión alterada.

15. La composición de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o el sistema de suministro con objetivo aislado para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador está directa o indirectamente a través de un conector o espaciador unido a la célula.

Fig. 1

A) Cadena H de ferrina de mamifero (SEO ID NO: 1 a 7)

```

Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
H_Per_H .....
H_Per_S .....
Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
H_Per_H .....
H_Per_S .....
Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
Ma_Per_H .....
Ma_Per_S .....
H_Per_H .....
H_Per_S .....

```

RESUMEN DE LA CADENA H DE FERRINA DE MAMIFERO (SEO ID NO: 1 a 7)

B) Cadena L de ferrina de mamifero (SEO ID NO: 8 a 14)

```

Ma_Per_L .....
Ma_Per_S .....
Ma_Per_L .....
Ma_Per_S .....
H_Per_L .....
H_Per_S .....
Ma_Per_L .....
Ma_Per_S .....
Ma_Per_L .....
Ma_Per_S .....
H_Per_L .....
H_Per_S .....

```

RESUMEN DE LA CADENA L DE FERRINA DE MAMIFERO (SEO ID NO: 8 a 14)

Fig. 2

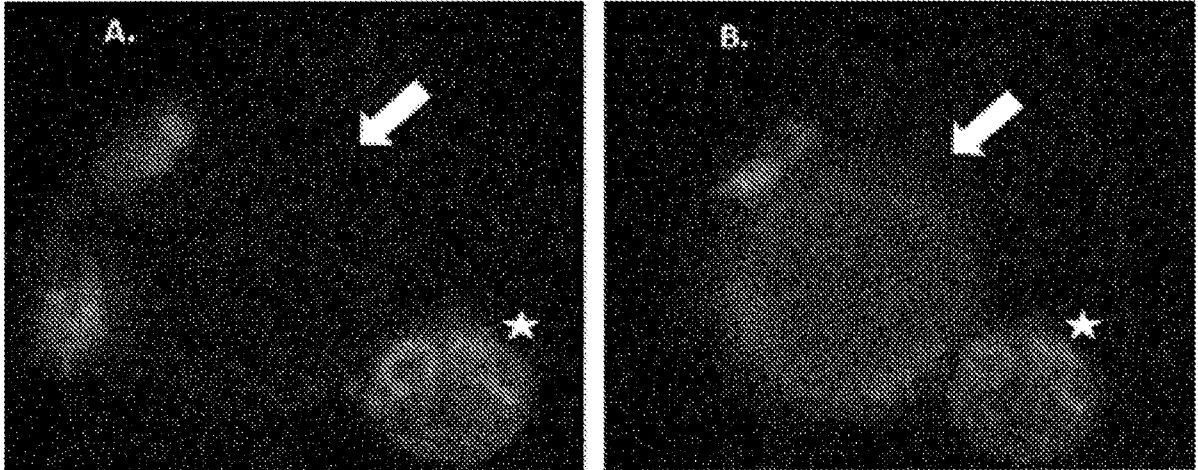


Fig. 3

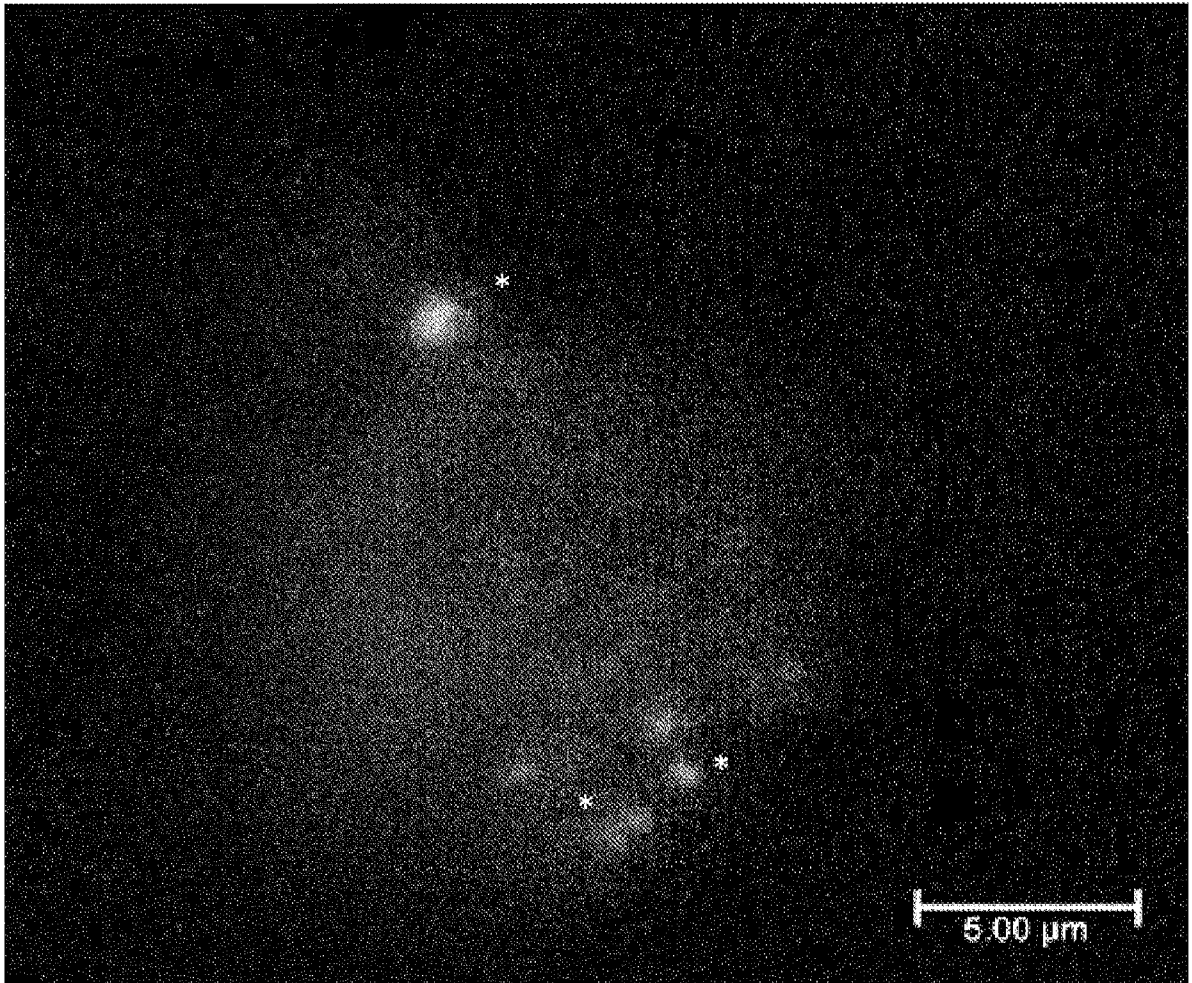


Fig. 4

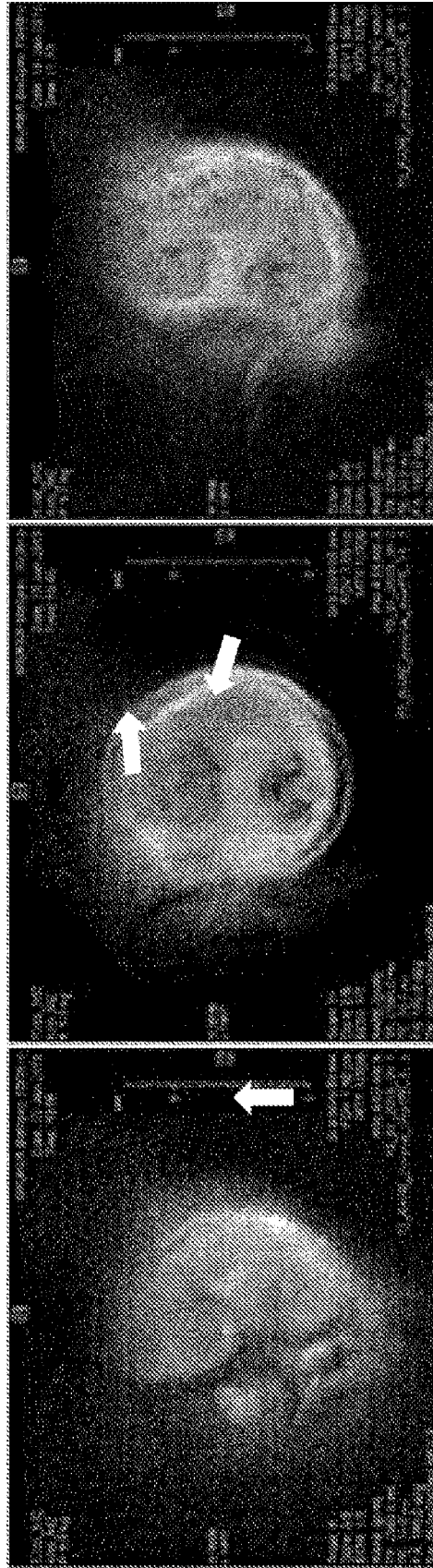


Fig. 5

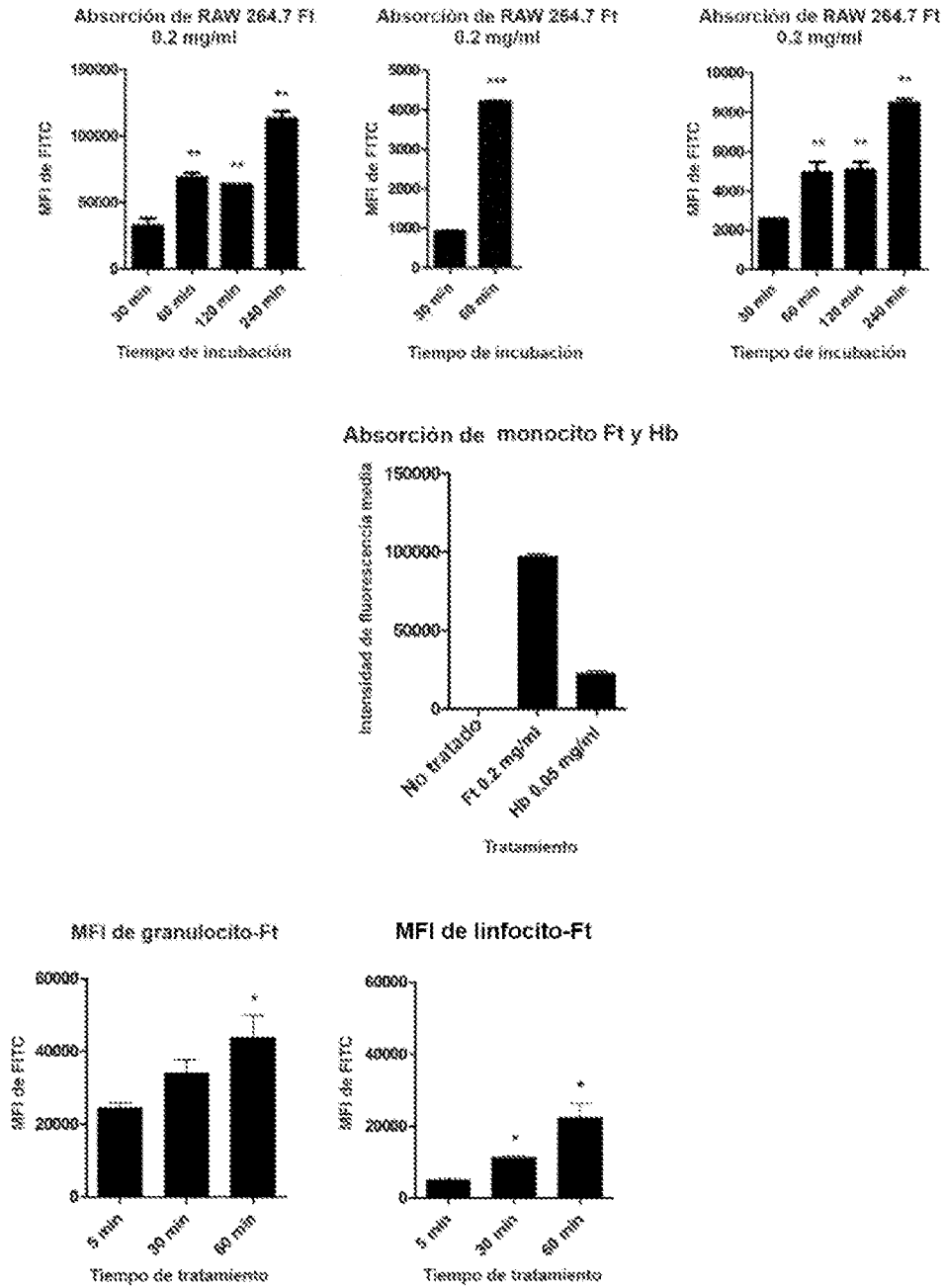
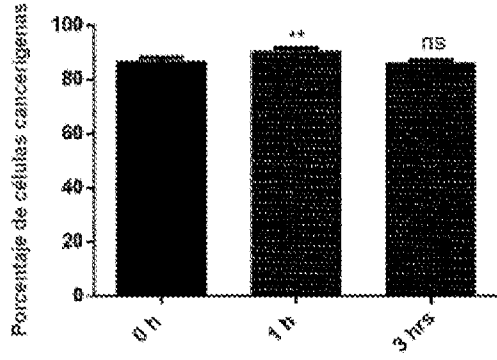
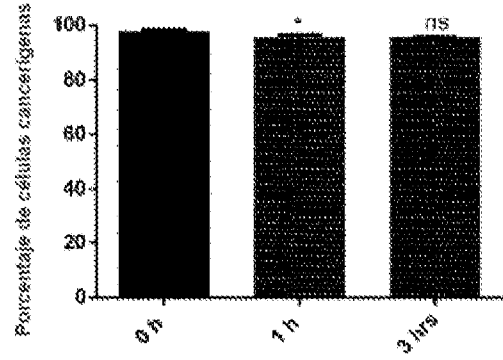


Fig. 6

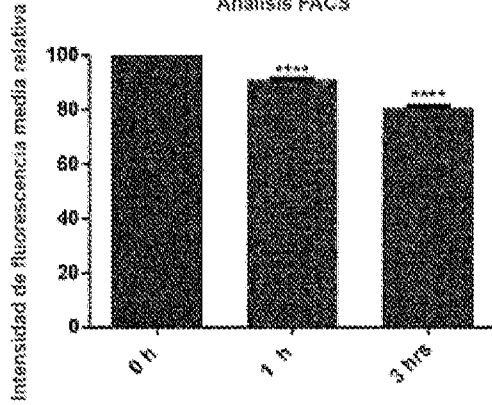
Fuga de Ft-banoxantrona (0.6 mg/ml) de las células al medio
Análisis FACS



Fuga de Ft-banoxantrona (0.8 mg/ml) de las células al medio
Análisis FACS



Fuga de Ft-banoxantrona (0.2 mg/ml) de las células al medio
Análisis FACS



Fuga de Ft-banoxantrona (0.8 mg/ml) de las células al medio
Análisis FACS

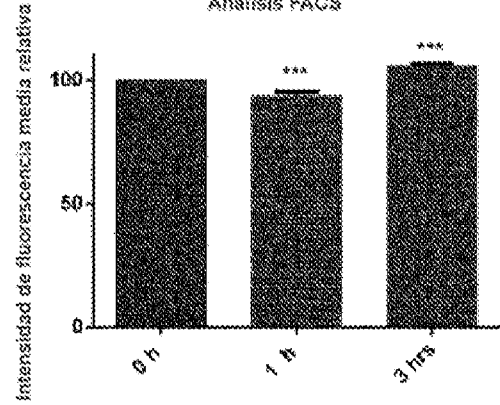


Fig. 7

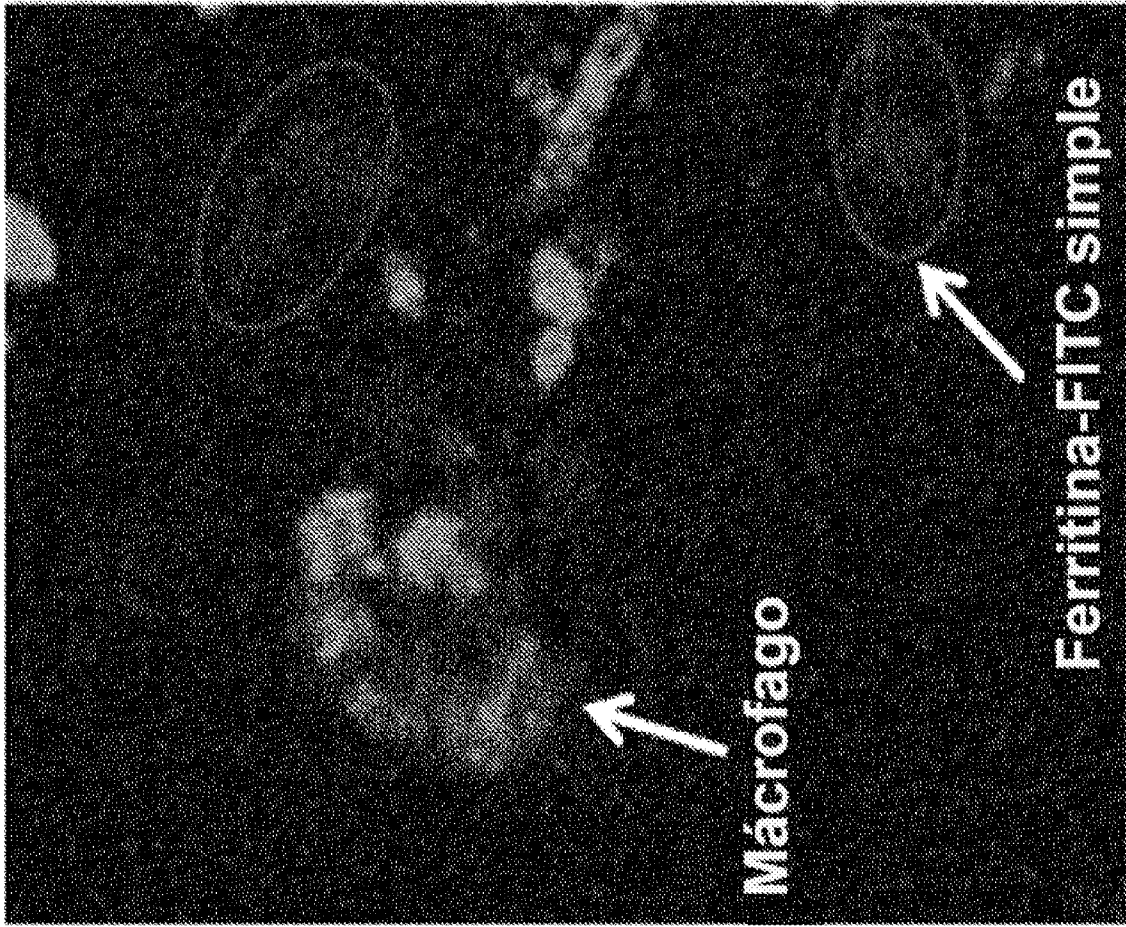


Fig. 8

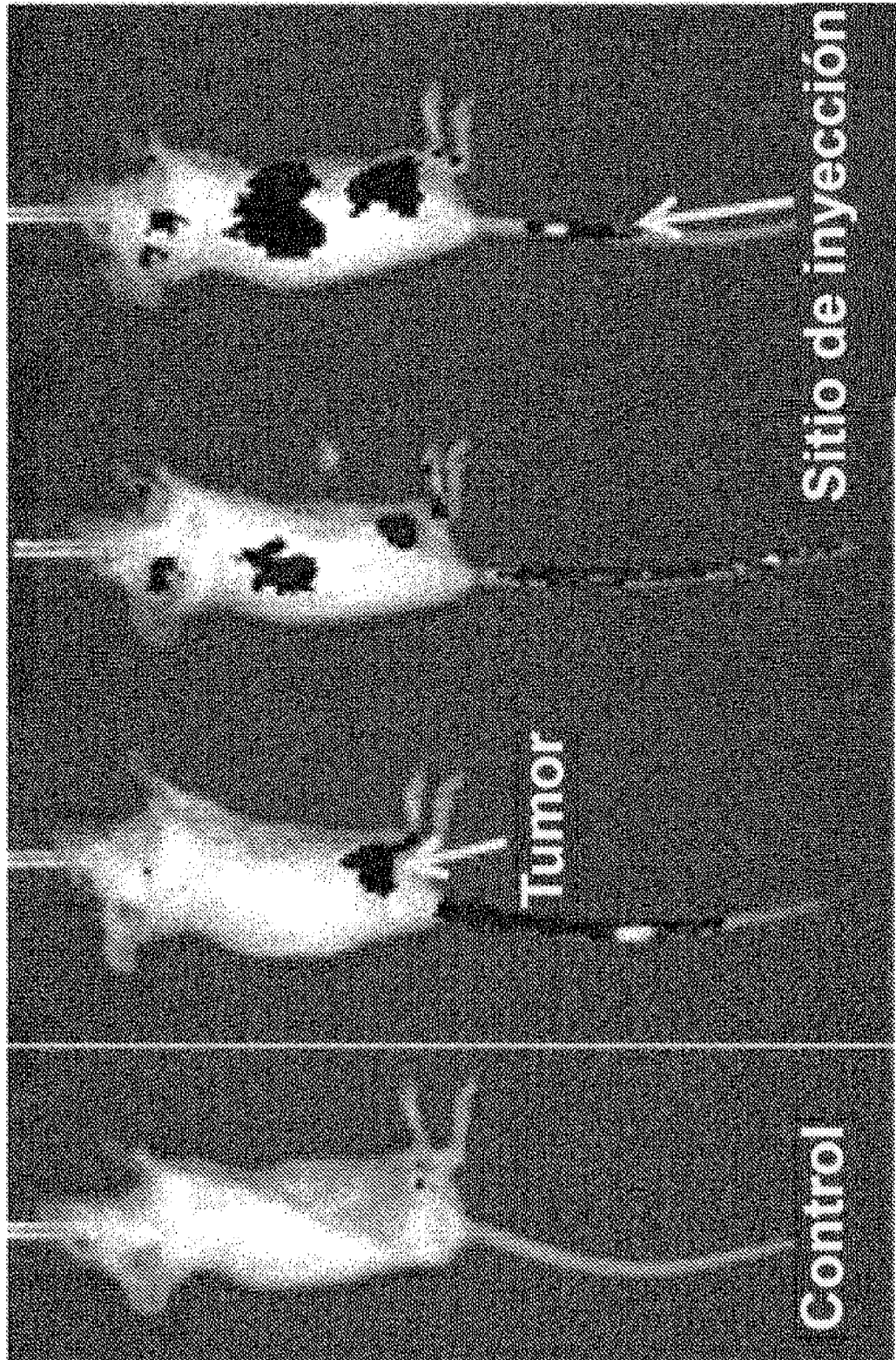


Fig. 9

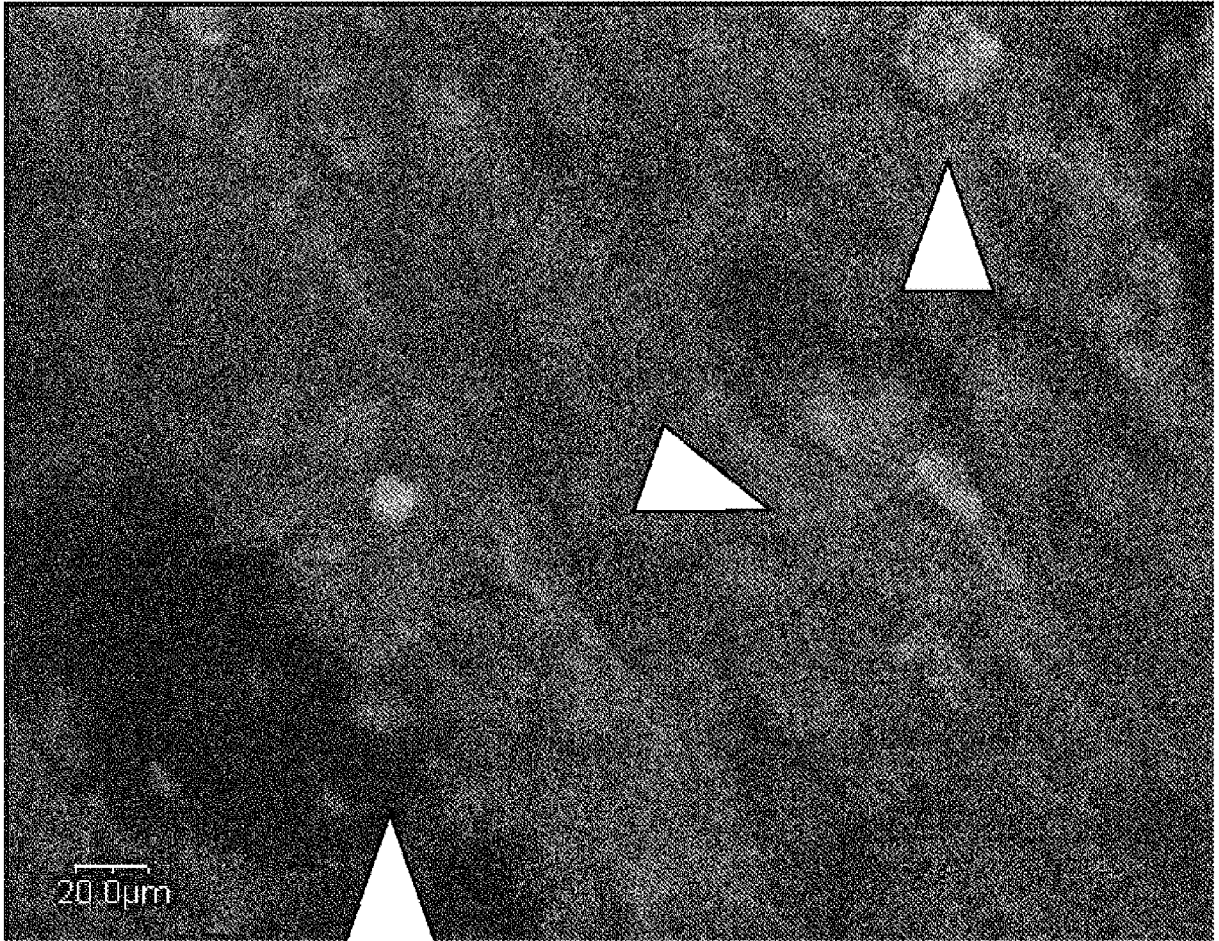


Fig. 10

