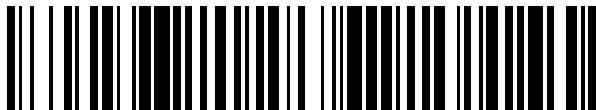


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 821 758**

(51) Int. Cl.:  
**A61K 9/127** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2015 PCT/IB2015/050436**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110957**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2015 E 15701846 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3096741**

---

(54) Título: **Proceso para la producción de híbridosomas**

(30) Prioridad:

**21.01.2014 US 201461929559 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2021**

(73) Titular/es:

**ANJARIUM BIOSCIENCES AG (100.0%)  
Wagistrasse 25  
8952 Schlieren, CH**

(72) Inventor/es:

**DE BEER, JOEL**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

**ES 2 821 758 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

Proceso para la producción de híbridosomas

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de vehículos farmacéuticos biocompatibles y a la administración dirigida de agentes activos para aplicaciones terapéuticas, profilácticas, de imagenología, y de diagnóstico. Más específicamente, la invención se refiere a un proceso para preparar un vehículo híbrido biocompatible que resulta de la unificación controlada de un módulo de administración biocompatible (BDM) secretado naturalmente y un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM).

### Antecedentes de la invención

10 Las estrategias de terapias con fármacos contemporáneas se basan principalmente en el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas, así como en el avance de los esquemas de tratamientos combinados. Sin embargo, la eficacia clínica de estas estrategias está limitada de forma inherente por sus atributos físico-químicos, farmacocinéticos y de reactividad cruzada, que surgen inadvertidamente de una concentración restringida en el sitio de acción pretendido y una biodistribución global extensa.

15 En un esfuerzo para abordar este reto, el dominio emergente de la nanotecnología está facilitando la administración de moléculas de fármaco a órganos, tejidos y/o células no sanas. Las plataformas de administración de fármacos inspiradas en la nanotecnología más avanzadas se centran en el atrapamiento de moléculas terapéuticamente activas en sistemas vehiculares basados en lípidos sintéticos. La encapsulación facilita el aislamiento de un fármaco del entorno *in vivo*, superando de esta forma las propiedades no ideales de un fármaco, incluyendo solubilidad limitada, estabilidad en suero, 20 semivida en circulación y biodistribución.

El nanovehículo sintético ideal que está compuesto por constituyentes no tóxicos y se internaliza específicamente por las células diana sigue siendo elusivo hasta la fecha. Por lo tanto, estos sistemas no aprovechan el potencial completo que puede proporcionar la nanotecnología. Las informaciones acerca de cómo las moléculas se transmiten en la naturaleza pueden proporcionar el plan de acción para vehículos de administración de fármacos eficientes y biocompatibles.

25 Se sabe que las células intercambian información a través de la secreción de factores solubles o por interacción directa. Estudios recientes han llegado a la conclusión de que las células también liberan vesículas derivadas de membrana que tienen un impacto tanto en las células vecinas como en las distantes (Marcus y Leonard, 2013). Estas vesículas extracelulares son secretadas por la mayor parte de las células, y son constituyentes fisiológicos de la mayor parte de los fluidos biológicos (Vlassov, Magdaleno, Setterquist, y Conrad, 2012). Las vesículas extracelulares comportan los subtipos 30 de cuerpos apoptóticos, microvesículas, y exosomas (E L Andaloussi, Mäger, Breakefield, y Wood, 2013).

Palmerini et al., 2006 se refiere al papel del colesterol, DOTAP, y DPPC en la interacción y fusión del prostasoma/espermatozoide. Los prostasomas son vesículas membranosas presentes en el semen humano eyaculado y son ricas en colesterol y pueden interaccionar con los espermatozoides. En este estudio, se mezclaron prostasomas con liposomas preparados a partir de diversos lípidos, tales como N-[1-(2,3-dioleoloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 35 DOTAP/1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina (DPPC, relación molar de 4:1) y DOTAP/colesterol (relación molar de 4:1) a diferentes valores de pH (5-8). El mezclado de las fases lipídicas (fusión) se determinó por el alivio del auto-apantallamiento de cloruro de octadecil rodamina B (R(18)) y los radios de las vesículas, por mediciones de dispersión de la luz. El mezclado de los lípidos y los radios de los prostasomas se vieron ambos influidos por la adición de liposoma. La capacidad de las vesículas de fusionarse se vio afectada por el enriquecimiento tanto en lípido natural como artificial.

40 Aunque la investigación sobre cómo las vesículas extracelulares pueden actuar como mediadoras de la comunicación intercelular todavía se encuentra en estadios tempranos, la exploración de su papel heredado en la administración de carga bioactiva desde las células "donantes" a las células "receptoras" está contribuyendo a obtener informaciones valiosas sobre la complejidad de la administración óptima de fármacos. Diversos estudios han identificado varias condiciones en las que las vesículas extracelulares pueden funcionar como vehículos terapéuticos. Hay una evidencia creciente de que 45 estos vehículos poseen características distintivas que los hacen farmacéuticamente superiores a los vehículos de fármacos sintéticos. Para esta superioridad, es particularmente significativa una colección de proteínas de membrana y lípidos distintos integrados en la composición de la superficie de las vesículas extracelulares.

Existen diversos obstáculos que dificultan la explotación o mimetismo de la naturaleza de los vehículos para sistemas de administración de fármacos eficientes. De forma más notable, la transformación de las vesículas extracelulares de portadores del mensaje a transportadores de fármacos requiere la introducción de moléculas terapéuticas o de diagnóstico exógenas para la célula "donante". Las metodologías de ingeniería respectivas propuestas hasta la fecha incluyen el uso de procedimientos de bioingeniería sobre las células "donantes" (es decir, modificación genética, transfección viral,

lipofección catiónica tóxica, etc.), así como mecanismos de manipulación vigorosa o dañina aplicados a vesículas aisladas (es decir, electroporación, química de conjugación, etc.). Estos métodos elevan finalmente las preocupaciones sobre la seguridad, así como escalabilidad y dificultan una traslación a la clínica. Otros asuntos importantes que todavía es necesario abordar incluyen el control sobre la integridad estructural del vehículo, la encapsulación eficiente de la carga activa y la incorporación de restos de direccionamiento adicionales.

5

Idealmente, se podrían eludir las estrategias de funcionalización biomiméticas complejas que requieren numerosos componentes de membrana bioactivos incorporados en un nanovehículo sintético si pudieran explotarse las membranas de las vesículas extracelulares. A la inversa, con el fin de superar las malas consecuencias de los protocolos biotecnológicos, las estrategias para introducir componentes terapéuticos, así como de direccionamiento, exógenos a las vesículas extracelulares, deberían ser preferiblemente independientes de la manipulación celular. Sobre la base de estas premisas, puede ser beneficioso reemplazar las técnicas de bioingeniería por estrategias nanotecnológicas empleadas en los modernos sistemas de administración de fármacos por nanopartículas.

10

A la vista de las carencias mencionadas anteriormente, es un objeto de la invención proporcionar un proceso para la fabricación de un vehículo farmacéutico de una manera controlable que implica módulos que responden a estímulos.

15 Los propósitos y ventajas adicionales de esta invención serán evidentes al proceder la descripción.

#### **Resumen de la invención**

Un vehículo biocompatible híbrido (hibridosoma) tal y como se usa en la presente memoria comprende elementos estructurales y bioactivos que se originan de al menos un módulo de administración biocompatible (BDM) y al menos un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM) que comprende al menos un resto fusogénico ajustable.

20

La descripción de la solicitud se refiere generalmente a un proceso para la fabricación de un vehículo biocompatible híbrido (hibridosoma) que comprende elementos estructurales y bioactivos que se originan de al menos un módulo de administración biocompatible (BDM) y al menos un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM) que comprende al menos un resto fusogénico ajustable, comprendiendo dicho proceso:

25 (a) proporcionar al menos un EDEM que tiene al menos un resto fusogénico o una composición que comprende el mismo;

(b) proporcionar al menos un BDM o una composición que comprende el mismo;

(c) poner en contacto dicho al menos un EDEM con dicho al menos un BDM a un pH por debajo de 7,4 y a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, uniendo de esta manera dicho al menos un EDEM con dicho al menos un BDM y produciendo dicho hibridosoma; y opcionalmente

30 (d) purificar dicho hibridosoma de los EDEM y/o BDM no fusionados.

La presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de un vehículo biocompatible híbrido (hibridosoma), comprendiendo dicho proceso:

35 (a) proporcionar una primera vesícula que comprende una membrana y uno o más agentes terapéuticos y/o de diagnóstico encapsulados en dicha primera vesícula, en donde dicha primera vesícula se ha producido *in vitro*, en donde dicha primera vesícula se selecciona del grupo que consiste en nanopartículas basadas en lípidos (LNP), liposomas, LNP estabilizadas con polímero, cerasomas, esfingosomas, niosomas, polimersomas, LNP estabilizadas con nanopartículas sintéticas,

40 nanopartículas hibridas lípido-polímero con núcleo-cubierta, LNP derivadas de membranas naturales, y LNP recubiertas con membrana naturales, y en donde dicha primera vesícula comprende al menos un resto fusogénico que permite o potencia la disrupción de una membrana o mezclado de lípidos entre una membrana y una bicapa lipídica, en donde el al menos un resto fusogénico es un lípido catiónico ionizable que tiene al menos un grupo protonable o desprotonable, de manera que el lípido está cargado positivamente a un pH a o por debajo del pH fisiológico, y es neutro a o por encima del pH fisiológico;

45 (b) proporcionar una segunda vesícula que comprende una bicapa lipídica, que se produce *in vivo* y se libera en el entorno extracelular; y

(c) poner en contacto dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula a un pH por debajo de 7,4 y a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, uniendo de esta manera dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula y produciendo dicho hibridosoma.

En el significado de la invención, la primera vesícula debe entenderse como EDEM, y la segunda vesícula debe entenderse como BDM.

El proceso de la invención se describe con detalle en la parte de la Descripción Detallada y los Ejemplos y Figuras.

Los híbridosomas pueden usarse para administrar uno o más agentes bioactivos en un leucocito por la puesta en contacto de una composición que comprende un híbridosoma que incluye dichos uno o más agentes bioactivos con una composición que comprende dicho leucocito, en donde dicho híbridosoma resulta de la fusión de al menos un EDEM que comprende al menos un resto fusogénico ajustable con al menos un BDM derivado de leucocito.

Los híbridosomas pueden usarse para administrar uno o más agentes bioactivos en una célula glial por la puesta en contacto de una composición que comprende un híbridosoma que incluye dichos uno o más agentes bioactivos con una composición que comprende dicha célula glial, en donde dicho híbridosoma resulta de la fusión de al menos un EDEM que comprende al menos un resto fusogénico ajustable con al menos un BDM derivado de célula glial.

Los híbridosomas pueden usarse para administrar uno o más agentes bioactivos en una célula durante una expansión ex vivo por la puesta en contacto de una composición que comprende un híbridosoma que incluye dichos uno o más agentes bioactivos con una composición que comprende dicha célula, en donde dicho híbridosoma resulta de la fusión de al menos un EDEM que comprende al menos un resto fusogénico ajustable con al menos un BDM derivado de dicha célula.

#### **Descripción breve de los dibujos**

Las características y ventajas anteriores y otras de la invención serán más fácilmente evidentes mediante los siguientes ejemplos, y con referencia a los dibujos adjuntos (siempre que los dibujos no se refieran al proceso reivindicado como se define en las reivindicaciones, los dibujos son solo para referencia), en donde:

La FIG. 1 es un gráfico que muestra los espectros de absorción de UV-Vis de Au-iLNP, Au Stock e iLNP;

La FIG. 2 es una fotografía de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de Au-iLNP (barra de escala: 100 nm);

La FIG. 3 es un histograma de diámetros de GBM-exos e iLNP vacías (obtenido por análisis de rastreo de nanopartículas (NTA));

La FIG. 4 es un gráfico que muestra el tamaño medio de las partículas después de mezclar GBM-exos e iLNP en condiciones no ionizantes (pH 7,4), o en tampón de fusión (pH 5,5) (obtenido mediante dispersión de la luz dinámica (DLS));

La FIG. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de GBM-exos e iLNP con diversas condiciones de pH del tampón;

La FIG. 6 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de GBM-exos e iLNP que contiene un contenido de DLinDMA del 0, 30, 40 o 50 %;

La FIG. 7 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de GBM-exo e iLNP que contiene el lípido ionizable DODAP o DLinDMA;

La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de GBM-exos e iLNP que contiene un contenido variado de PEG-lípido;

La FIG. 9 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de GBM-exos e iLNP a temperaturas variadas;

La FIG. 10 es un gráfico obtenido mediante espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS) de una mezcla de GBM-exos e iLNP a pH 5,5;

La FIG. 11 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo del diámetro medio de las partículas de una mezcla de GBM-exos e iLNP a pH 5,5 monitorizado por dispersión de la luz dinámica (DLS);

La FIG. 12 es un gráfico que muestra el cambio dependiente del tiempo del diámetro medio de las partículas y del índice de polidispersidad de una mezcla de MCL-exos e iLNP a pH 5,5 monitorizado por dispersión de la luz dinámica (DLS);

La FIG. 13 presenta cinco histogramas que muestran las distribuciones de partículas de iLNP y mezclas de exosomas después de 3, 5, 7, 9 y 18 minutos de mezclado a pH 5,5;

La FIG. 14 es un gráfico que muestra la superposición de las distribuciones de tamaño NTA de iLNP, exosomas e híbridosomas.

La FIG. 15 es un gráfico que muestra el análisis por citometría de flujo de células que expresan GFP 72h después de la transfección de cantidades equivalentes de pDNA en iLNP, iLNP no fusionadas con exosomas, e híbridosomas. El tiempo indica los tiempos de transfección;

5 La FIG. 16 es un gráfico que muestra los fotones medios de DLS por segundo indicativo de la presencia de nanopartículas en cada fracción de densidad de gradiente de sacarosa de pDNA-iLNP;

La FIG. 17 es un gráfico que muestra los resultados de un análisis por citometría de flujo de células que expresan GFP 72h después de la transfección con densidad de partículas combinadas;

10 La FIG. 18 es un gráfico que muestra los resultados de un análisis por citometría de flujo de células que expresan GFP 72h después de la transfección de cantidades equivalentes de híbridosomas purificados. El tiempo indica los tiempos de transfección;

La FIG. 19 es un gráfico que muestra los resultados de citometría de flujo de una incubación de 24 h de híbridosomas IgG purificados marcados con anticuerpos secundarios IgG (control: gris claro, anticuerpo secundario IgG: gris);

La FIG. 20 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de exosomas e iLNP que contienen oligonucleótidos;

15 La FIG. 21 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de exosomas y e iLNP que encapsulan nanopartículas sólidas o iLNP que coencapsulan oligonucleótido/nanopartículas;

La FIG. 22 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de exosomas e iLNP que encapsulan proteínas;

20 FIG. 23 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de exosomas e iLNP modificadas en superficie;

La FIG. 24 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión pireno de MCL-exosomas solos o mezclados con iLNP fabricados por mezclado microfluídico rápido o por extrusión;

La FIG. 25 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de iLNP vacías y PMN-MV marcadas en tampón de fusión o tampón pH 7,4, así como iLNP encapsulando diferentes especies de carga;

25 La FIG. 26 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de fusión con R18 de iLNP vacías y PLT-MV marcadas en tampón de fusión o tampón pH 7,0; y

La FIG. 27 es un histograma que muestra la intensidad de fluorescencia media de células Jeko1 transfectadas durante 1 h con híbridosomas preparados con iLNP marcadas con NBD o iLNP marcadas con NBD solas (n=160 células, la barra de error indica el error estándar).

### 30 Descripción detallada

Un vehículo biocompatible híbrido (híbridosoma) tal y como se usa en la presente memoria comprende elementos estructurales y bioactivos que se originan de al menos un módulo de administración biocompatible (BDM) y al menos un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM) que comprende al menos un resto fusogénico ajustable.

35 La presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de un vehículo biocompatible híbrido (híbridosoma), comprendiendo dicho proceso:

(a) proporcionar una primera vesícula que comprende una membrana y uno o más agentes terapéuticos y/o de diagnóstico encapsulados en dicha primera vesícula, en donde dicha primera vesícula se ha producido *in vitro*, en donde dicha primera vesícula se selecciona del grupo que consiste en nanopartículas basadas en lípidos (LNP), liposomas, LNP estabilizadas con polímero, cerasomas, esfingosomas, niosomas, polimersomas, LNP estabilizadas con nanopartículas sintéticas, nanopartículas híbridas lípido-polímero con núcleo-cubierta, LNP derivadas de membranas naturales, y LNP recubiertas con membranas naturales, y en donde dicha primera vesícula comprende al menos un resto fusogénico que permite o potencia la disrupción de una membrana o mezclado de lípidos entre una membrana y una bicapa lípídica, en donde el al menos un resto fusogénico es un lípido catiónico ionizable que tiene al menos un grupo protonable o desprotonable, de manera que el lípido está cargado positivamente a un pH a o por debajo del pH fisiológico, y es neutro a o por encima del pH fisiológico;

- (b) proporcionar una segunda vesícula que comprende una bicapa lipídica, que se produce *in vivo* y se libera en el entorno extracelular; y
- (c) poner en contacto dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula a un pH por debajo de 7,4 y a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, uniendo de esta manera dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula y produciendo dicho híbridosoma.
- En una realización, dicho contacto se realiza en un tampón que tiene un pH entre 4 y 6.
- En una realización, dicho contacto se realiza a una temperatura de reacción de 37 °C.
- En una realización, dicho lípido catiónico ionizable se selecciona del grupo que consiste en 1,2-DiLinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-(dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), YSK05, ácido 4-(((2,3-bis(oleoiloxi)propil)-(metil)amino)metil)benzoico (DOBAT), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), ácido 3-((2,3-bis(oleoiloxi)propil)(metil)amino)propanoico (DOPAT), N-(2-carboxipropil)-N,N-dimetil-2,3-bis-(oleoiloxi)-propan-1-amino (DOMPAQ), N-(carboximetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOAAQ), Alny-100, 3-(dimetilamino)-propil(1Z,15Z)-3-[(9Z,12Z)octadeca-9,12-dien-1-il]-henicos-12,15-dienoato (DMAP-BLP).
- En una realización, dicha primera vesícula comprende un resto de direccionamiento, en donde el resto de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, péptidos, proteínas, aptámeros, oligonucleótidos y polisacáridos.
- En una realización, dicha primera vesícula comprende un lípido modificado con PEG.
- En realizaciones particulares, dicho lípido modificado con PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-fosfolípido, fosfatidiletanolamina modificada con PEG (PEG-PE), ceramidas modificadas con PEG, dialquilaminas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG, polietilen glicol dipalmitoilglicerol (PEG-DPG), dialquilgliceroles modificados con PEG, (metoxi polietilen glicol)-dimiristolglicerol (PEG-s-DMG), un PEG-dialquiloglicerilo (DAA), R-3-[ $\omega$ -metoxi-poli(etilenglicol)2000)carbamoi]-1,2-dimiristoloxipropil-3-amino (PEG-c-DOMG), y N-acetilgalactosamina-((R)-2,3-bis(octadeciloxi)propil-1(metoxi-poli(etilen glicol)2000)propilcarbamato)) (GalNAc-PEG-DSG).
- En una realización, dicho uno o más agentes terapéuticos se seleccionan de:
- (i) un fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable;
  - (ii) un agente terapéutico basado en anticuerpo;
  - (iii) un péptido, o una proteína, y
  - (iv) un ácido nucleico.
- En una realización, dicho agente terapéutico es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARN antisentido, micro ARN (miARN), ARN en horquilla pequeño o corto (ARNsh), ARN guía (ARNg), ARN con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente (ARNcr), ARN con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente de activación en trans (ARNtracr), oligonucleótidos inmunostimuladores, plásmidos, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas.
- En una realización, dicha primera vesícula comprende una molécula de ácido nucleico y/o ARNm modificada que codifica al menos un antígeno.
- En una realización, dicha segunda vesícula comprende un antígeno asociado con una enfermedad seleccionado de un antígeno asociado con tumores y un antígeno asociado con patógenos.
- En una realización, dicho agente de diagnóstico es un radioisótopo que incluye uno o más radionúclidos seleccionados del grupo que consiste en <sup>225</sup>Ac, <sup>72</sup>As, <sup>211</sup>At, <sup>11</sup>B, <sup>128</sup>Ba, <sup>212</sup>Bi, <sup>75</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>14</sup>C, <sup>109</sup>Cd, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>3</sup>H, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>130</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>117</sup>Lu, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>212</sup>Pb, <sup>103</sup>Pd, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>47</sup>Sc, <sup>153</sup>Sm, <sup>89</sup>Sr, <sup>99m</sup>Tc, <sup>88</sup>Y y <sup>90</sup>Y.
- En una realización, dicho agente de diagnóstico se selecciona de un punto cuántico, y una nanopartícula de metal seleccionada de una nanopartícula de oro o plata.
- En una realización, dicha segunda vesícula deriva de
- (i) una célula tumoral de un paciente con cáncer o precáncer, o deriva de una línea de células tumorales o cancerosas;

- (ii) una célula de glioblastoma o una célula de linfoma de células del manto;
- (iii) una célula seleccionada del grupo que consiste en células B, células presentadoras de antígenos, linfocitos, trombocitos, neutrófilos, neutrófilos polimorfonucleares activados y leucocitos;
- 5 (iv) un patógeno seleccionado de un grupo que consiste en un patógeno bacteriano, patógeno amebiano, patógeno parasitario o patógeno fúngico; o
- (v) una célula infectada con patógeno.

En el significado de la invención, la primera vesícula debe entenderse como EDEM, y la segunda vesícula debe entenderse como BDM.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "vehículo biocompatible híbrido" o "hibridosoma" se refieren a un vehículo biocompatible híbrido que comprende elementos estructurales y bioactivos (p. ej., lípidos, carbohidratos, ácidos grasos, polinucleótidos o polipéptidos) que se originan de al menos un módulo de administración biocompatible (BDM) (p. ej., exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos) y al menos un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM) que comprende un resto fusogénico ajustable. El volumen interno del hibridosoma puede contener al menos un agente bioactivo que se origina de un BDM secretado *in vivo* (p. ej., polinucleótidos, enzimas o polipéptidos endógenos) y al menos un agente bioactivo encapsulado en un EDEM fabricado *in vitro*. El volumen interno del hibridosoma puede comprender solo componentes naturales que se originan de BDM y puede tratarse adicionalmente. El hibridosoma resulta de la unión de un BDM con un EDEM, varios BDM con un EDEM, varios EDEM con un BDM, o varios BDM con varios EDEM. El evento de unión puede controlarse a través del tamaño de los BDM y EDEM, sus cargas respectivas, y las condiciones aplicadas durante una reacción de unión tales como la relación BDM/EDEM, el pH, la temperatura y el tiempo de la reacción. Dicha estrategia modular para ensamblar una nueva composición a partir de unidades separadas puede ofrecer un nuevo nivel de flexibilidad en la ingeniería. Esta unificación de componentes mensajeros y terapéuticos podría conferir características únicas al vehículo híbrido resultante que de otra manera no se conseguirían por sistemas únicos.

25 Tal y como se usa en la presente memoria, "módulo de administración biocompatible (BDM)" se refiere a una vesícula secretada naturalmente que comprende una bicapa lipídica, que se produce *in vivo* y se libera en el entorno extracelular. Los BDM son secretados por varios tipos de células, incluyendo, pero no limitado a, células epiteliales, células tumorales y otras células inmunes (p. ej., mastocitos, linfocitos T y B, células dendríticas). Los BDM se aíslan bien de fluidos fisiológicos o de una muestra de tejido tomada de un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, o se aíslan de medios de cultivo. Por ejemplo, los BDM pueden derivar de un cultivo celular en donde las células son bien naturales o se han inmortalizado y/o preparado por ingeniería previamente. El cultivo celular puede ser homogéneo (un tipo de células) o heterogéneo (varios tipos de células), y puede estar compuesto por células y/o tejido aislado. Los BDM pueden aislarse o derivar de un organismo incluyendo procariotas, eucariotas, bacterias, hongos, levadura, invertebrados, vertebrados, reptiles, peces, insectos, plantas y animales. Los medios tomados de células cultivadas ("medio condicionado", medio de células, o medio de cultivo celular) pueden ser un fluido biológico.

35 Los BDM pueden recogerse y aislarse usando métodos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los BDM pueden recogerse de un sobrenadante de cultivo celular o tejido por una o más técnicas seleccionadas del grupo que consiste en, pero no limitado a, ultracentrifugación diferencial, ultracentrifugación de gradiente, filtración, filtración en flujo tangencial (TFF), filtración en membrana con surcos grabados de baja presión y combinaciones de los mismos. Los BDM usados en la presente invención se preparan por centrifugación del sobrenadante de cultivos para sedimentar los restos celulares no deseados seguido de ultracentrifugación para sedimentar los exosomas, ultracentrifugación de gradiente de densidad (por ejemplo, con gradiente de sacarosa) o una combinación de estos métodos.

40 Los BDM pueden variar en tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 2.000 nm y pueden contener moléculas biológicamente activas (p. ej., polinucleótido y/o polipéptidos). Los ejemplos de BDM incluyen, pero no están limitados a, "exosomas" (aproximadamente 30 nm a aproximadamente 200 nm de diámetro), "microvesículas" (aproximadamente 100 nm a aproximadamente 2.000 nm de diámetro), y "cuerpos apoptóticos" (aproximadamente 300 nm a aproximadamente 2.000 nm de diámetro). El término BDM se usa indistintamente con "exosoma", "microvesícula" o "cuerpo apoptótico", "partículas de membrana", "vesículas de membrana", "vesículas semejantes a exosomas", "vesículas semejantes a ectosomas", "ectosomas" o "exovesículas". La bicapa lipídica del BDM deriva de membranas de la célula donante. Los BDM derivados de diferentes tipos de células pueden mostrar diferencias en la composición de lípidos en comparación con la membrana plasmática. Durante la génesis de los exosomas, las proteínas transmembrana y de membrana periférica pueden incluirse en la membrana de la vesícula, y al mismo tiempo, los componentes citosólicos también pueden incorporarse en las vesículas.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "endógeno" se refiere a un compuesto producido naturalmente por una célula y que deriva de la célula. Por ejemplo, un BDM contiene un polipéptido endógeno si ese polipéptido se produjo en la célula de la que deriva el BDM.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secretado naturalmente" tal y como se aplica a un vehículo, una partícula, una vesícula o molécula se refiere a un vehículo, una partícula, una vesícula o molécula que se libera al entorno de una célula, un organismo o tejido por un proceso encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, el exosoma que puede aislarse de una fuente y que no se ha translocado físicamente desde los límites de la fuente por un ser humano en el laboratorio se secreta naturalmente. Un ejemplo adicional no limitante para las partículas que se secretan del proceso en la naturaleza es la fusión de un orgánulo intracelular con la membrana de la célula o formación de vacuolas en la membrana de la célula.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, "módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM)" se refiere a una vesícula que comprende una o más membranas que se han producido *in vitro*. Los EDEM se seleccionan de, pero no están limitados a, nanopartículas basadas en lípidos (LNP), liposomas, LNP estabilizadas con polímero, cerasomas, esfingosomas, niosomas, polimersomas, LNP estabilizadas con nanopartículas sintéticas, nanopartículas híbridas con núcleo-cubierta lípido-polímero, LNP derivadas de membranas naturales, nanopartículas de lípidos eliminadas rápidamente (reLNP) y LNP recubiertas de membranas naturales. Los EDEM tienen al menos una propiedad estructural que permite su unión controlada con los BDM. Por ejemplo, dicha propiedad estructural se proporciona por uno o más constituyentes de la o las bicapas lipídicas del EDEM. El EDEM puede ser una LNP ionizable (iLNP).

15 20 Los EDEM pueden tener diversas morfologías. Pueden comprender bien una bicapa lipídica (vesícula unilamellar), una serie de bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos estrechos (vesícula multilamellar o MLV) o polímeros formadores de membrana. Además, a la inversa que los BDM, los EDEM son sustancialmente homogéneos en tamaño y distribución de densidad. Los EDEM pueden tener un diámetro (diámetro medio de partícula) de aproximadamente 15 a aproximadamente 500 nm. Por ejemplo, los EDEM pueden tener un diámetro de aproximadamente 300 nm o menos, 250 nm o menos, 200 nm o menos, 150 nm o menos, 100 nm o menos, o 50 nm o menos. El EDEM puede tener un diámetro de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 nm.

25 30 Los EDEM se fabrican de manera que presenten características físico-químicas específicas. Las características físico-químicas de cada EDEM específico pueden variar según la naturaleza y la concentración del o de los agentes activos atrapados en el mismo, la composición de la membrana de la membrana del polímero o bicapa(s) lipídica(s), la naturaleza del medio en el que se han dispersado los EDEM, su tamaño y polidispersidad. Los EDEM pueden comprender una membrana de bicapa lipídica que incluye lípidos catiónicos ionizables y lípidos auxiliares. Por ejemplo, los EDEM usados para generar el hibridosoma se fabrican sobre la base de una relación molar de DlinDMA:Col:DSPC:PEG-Cer (relación molar 40:40:17,5:2,5).

35 40 La fabricación de los EDEM puede llevarse a cabo a través de una variedad de maneras conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias. Estas incluyen, por ejemplo, sonicación, extrusión, alta presión/homogeneización, microfluidización, diáisisis con detergente, fusión inducida por calcio de liposomas pequeños y métodos de hidratación de película lipídica. Por ejemplo, las LNP pueden prepararse usando el método de vesícula preformada descrito previamente (Maurer et al., 2001). Típicamente, el método consiste en extruir las LNP a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño para reducir los tamaños de las LNP a una distribución de tamaños bien definida y, en un estadio posterior, si se requiere, los agentes terapéuticos se cargan en las vesículas preformadas. Alternativamente, los EDEM pueden prepararse a través del autoensamblaje espontáneo en un sistema microfluídico. Los protocolos para producir una distribución de tamaño bien definida con dichas técnicas de fabricación son conocidos en la técnica (Belliveau et al., 2012). Preferiblemente, los EDEM son sustancialmente homogéneos en distribución de tamaño y densidad para facilitar la separación de subpoblaciones de BDM e hibridosomas. La separación se hace usando técnicas muy conocidas en la técnica, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño y centrifugación de gradiente de densidad. La densidad de los EDEM puede ser menor que la de del hibridosoma, facilitando de esta manera la separación de las vesículas híbridas de los EDEM mediante centrifugación de gradiente de densidad de sacarosa.

45 50 55 Tal y como se usa en la presente memoria, un "resto fusogénico" se refiere a lípidos fusogénicos o cualquier otro componente fusogénico del EDEM o hibridosoma. Dicho resto fusogénico potencia o permite la disruptión de la membrana, o mezclado de lípidos entre una membrana y una bicapa lipídica. Por ejemplo, la primera membrana puede ser del EDEM mientras la segunda membrana engloba el BDM. Alternativamente, la primera membrana puede ser la del hibridosoma mientras la segunda membrana es una membrana de la superficie externa de la célula, una membrana endosómica, una membrana lisosomal o una membrana nuclear. El resto fusogénico incrementa la interacción del EDEM o del hibridosoma que comprende dicho resto fusogénico con una segunda membrana, estimulando de esta manera el mezclado de los lípidos de la membrana y el mezclado del volumen interno y los contenidos encapsulados. Alternativamente, el resto fusogénico puede incrementar la entrada en, o la salida desde, un compartimento celular. Dichos compartimentos pueden ser, por ejemplo, endosomas o el núcleo. El resto fusogénico puede ser, por ejemplo, un factor de direccionamiento tal

como un polímero sintético que disrumpe la membrana, o, por ejemplo, un polipéptido de traslocación de membrana que responde al pH (p. ej., Melitina). El resto fusogénico puede comprender un segmento fusogénico (p. ej., el grupo de cabeza de un lípido, el grupo de cola de un lípido, bloque o región de un polímero, un segmento de un péptido).

5 Por el término "ajustable" tal y como se usa en la presente memoria, se quiere decir que mediante la variación de las condiciones de la reacción (p. ej., pH, temperatura, sales) del método de la presente invención y/o mediante la variación de las cantidades de los componentes fusogénicos (p. ej., lípidos ionizables, lípido fusogénico, polímero que responde al pH, lípidos auxiliares, resto de direccionamiento fusogénico) del EDEM, es posible garantizar selectivamente altas propiedades fusogénicas del EDEM y/o BDM durante la reacción de unión mientras se mantiene una fusogenicidad relativa menor antes o después de la unión. Preferiblemente, en cada caso, el resto fusogénico puede tener una fusogenicidad ajustable a una cantidad deseada (p. ej., concentración) del mismo. Una característica fusogénica de un resto fusogénico puede determinarse por ensayos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, la fusogenicidad de un polímero puede determinarse en un ensayo celular *in vitro* tal como el ensayo de hemólisis de células sanguíneas rojas. Una actividad de polímero endosomolítica puede determinarse en un ensayo celular *in vitro*.

10 15 El término "lípido fusogénico" puede usarse para hacer referencia a lípidos que experimentan un cambio en su estructura y/o carga a pH bajo (es decir, pH de aproximadamente 5,5), cuando se compara con su carga o estructura a pH alto (es decir, pH de aproximadamente 7,4), que da lugar a que el lípido se vuelva más fusogénico. Estos lípidos fusogénicos pueden ser lípidos aniónicos, lípidos neutros o lípidos sensibles al pH que se caracterizan porque cuando el pH se cambia de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 4, el lípido experimenta un cambio en su carga o estructura de manera que se vuelve más fusogénico. El cambio en su carga o estructura también puede ocurrir viceversa de un pH aproximado de 4 a aproximadamente 6. Además, cuando la temperatura se eleva por encima de la temperatura de transición de fase, por ejemplo 20 °C, el lípido fusogénico experimenta un cambio en su estructura de manera que asume una estructura hexagonal o formadora de cono. Los lípidos fusogénicos de este tipo adicionales son conocidos en la técnica y pueden usarse en las formulaciones, complejos y métodos descritos en la presente memoria. Algunos ejemplos de estos lípidos "fusogénicos" cambian su estructura para adoptar una estructura hexagonal, mientras otros ejemplos de estos lípidos experimentan un cambio en su carga. Estos lípidos fusogénicos también pueden incluir aquellos referidos como lípidos "formadores de cono" en la técnica. El término "lípido fusogénico" también puede usarse para hacer referencia a lípidos que presentan propiedades de forma molecular de formación de cono de manera que la estructura del lípido comprende una cabeza polar transversal pequeña y un área transversal de cadena acilo más grande. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría específica, por encima de una temperatura específica (p. ej., 20 °C), se piensa que estos lípidos inducen una transición de fase H<sub>II</sub> hexagonal no de bicapa.

20 25 30 Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "lípido" y "lipoide" se refieren a un grupo de compuestos orgánicos que comprenden un grupo de cabeza polar que está unido a un grupo de cola lipófilo mediante un grupo conector. Los lípidos se caracterizan generalmente por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Los lípidos se dividen habitualmente en al menos tres clases: "lípidos simples" que incluyen grasas y aceites; "lípidos compuestos" que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; y "lípidos derivados" tales como esteroides. El término "lípido" y "lipoide" pueden usarse indistintamente.

35 40 45 Tal y como se usa en la presente memoria, "lípido auxiliar" se refiere a lípidos estabilizadores, incluyendo lípidos neutros y lípidos aniónicos. Algunos EDEM comprenden o pueden estar enriquecidos con uno o más lípidos auxiliares, tales como colesterol y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC). Un lípido neutro se refiere a varias especies de lípidos que existen bien en forma no cargada o neutra zwiteriónica a pH fisiológico. Los lípidos representativos incluyen, pero no están limitados a, diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dioleoil-fosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE) y dioleoil-fosfatidil-etanolamina, dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfo-etanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearioil-2-oleoil-fosfatidiletanol amina (SOPE), y 1,2-dielaidoilo-sn-glicero-3-fofoetanolamina (transDOPE). Un lípido aniónico es un lípido que está cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen fosfatidilglicerol, diacilfosfatidilslerina, cardiolipina y lípidos neutros con grupos modificadores aniónicos.

50 55 Tal y como se usa en la presente memoria, un "lípido catiónico ionizable" se refiere a un lípido que porta una carga positiva neta a un pH seleccionado (p. ej., por debajo del pH fisiológico). Dichos lípidos incluyen, pero no están limitados a, 1,2-Dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), dioctadecil-dimetilamonio (DODMA), Diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetil-amonio (DOTMA); 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), YSK05, ácido 4-(((2,3-bis(oleoiloxi)propil)-(metil)amino)metil)benzoico (DOBAT), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), ácido 3-((2,3-bis(oleoiloxi)propil)(metil)amino)propanoico (DOPAT), N-(2-carboxipropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)-propan-1-amino (DOMPAQ), N-carboximetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOAAQ), Alny-100, 3-(dimetilamino)-

propil(12Z,15Z)-3-[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il]-henicoso-12,15-dienoato (DMAP-BLP) y 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoi)colesterol (DC-Col).

El lípido catiónico ionizable puede ser un amino lípido. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "amino lípido" se pretende que incluya aquellos lípidos que tienen una o dos cadenas de ácidos grasos o alquilo graso y un grupo de cabeza amino (incluyendo un grupo alquilamino o dialquilamino) que pueden protonarse para formar un lípido catiónico. Por ejemplo, los amino lípidos o lípidos catiónicos tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de manera que el lípido está cargado positivamente a un pH a o por debajo del pH fisiológico (p. ej., pH 7,4), y es neutro a un segundo pH, preferiblemente a o por encima del pH fisiológico. Se entenderá, por supuesto, que la adición o eliminación de protones como una función del pH es un proceso en equilibrio, y que la referencia a un lípido cargado o neutro se refiere a la naturaleza de la especie predominante y no requiere que el lípido completo esté presente en la forma cargada o neutra. También pueden usarse los lípidos que tienen más de un grupo protonable o desprotonable, o que son zwiteriónicos.

El lípido catiónico puede sintetizarse por métodos conocidos en la técnica y/o como se describe en las Publicaciones Internacionales Nos. WO2012040184, WO2011153120, WO2011149733, WO2011090965, WO2011043913, WO2011022460, WO2012061259, WO2012054365, WO2012044638, WO2010080724, WO201021865 y WO2014089239; así como en las Publicaciones de EE. UU. Nos. US20140309277.

Debe indicarse que el término "ionizable" se refiere a un compuesto que tiene al menos un sitio ionizable en su estructura molecular, y no significa necesariamente "ionizado", es decir, el lípido catiónico ionizable puede estar bien en forma ionizada o no ionizada. Por ejemplo, los EDEM comprenden una combinación de lípidos catiónicos ionizables descrita anteriormente (p. ej., DLinDMA, DLin-KC2-DMA y/o DLin-MC3-DMA), con el fin de personalizar de manera precisa la carga superficial catiónica neta de los híbridosomas a pH fisiológico.

El término "polímero que responde al pH" se refiere a un polímero que, a un pH bajo, experimenta un cambio en su estructura o carga, cuando se compara con su carga o estructura a pH fisiológico (pH de aproximadamente 7,4), lo que da lugar a que el polímero se vuelva más fusogénico. Los polímeros pueden prepararse de homopolímeros de ácidos alquil acrílicos, tal como ácido butil acrílico (BAA) o ácido propil acrílico (PAA), o pueden ser copolímeros de ácido etil acrílico (EAA). También pueden usarse los polímeros de derivados de alquil amina o alquil alcohol de copolímeros de anhídrido maleico con metil vinil éter o estireno. Los polímeros pueden prepararse como copolímeros con otros monómeros. La adición de otros monómeros puede aumentar la potencia de los polímeros, o añadir grupos químicos con funcionalidades útiles para facilitar la asociación con otras entidades moleculares, incluyendo el esto de direccionamiento y/u otros materiales adyuvantes tales como poli(etilen glicol). Estos copolímeros pueden incluir, pero no están limitados a, copolímeros con monómeros que contienen grupos que pueden reticularse con un resto de direccionamiento.

En general, el polímero que responde al pH está compuesto por residuos monoméricos con propiedades particulares. Los residuos monoméricos aniónicos comprenden una especie cargada o que se puede cargar como un anión, incluyendo una especie aniónica protonable. Los residuos monoméricos aniónicos pueden ser aniónicos a un pH aproximadamente neutro de 7,2-7,4. Los residuos monoméricos catiónicos comprenden una especie cargada o que se puede cargar como un catión, incluyendo una especie catiónica desprotonable. Los residuos monoméricos catiónicos pueden ser catiónicos a un pH aproximadamente neutro de 7,2-7,4. Los residuos monoméricos hidrófobos comprenden una especie hidrófoba. Los residuos monoméricos hidrófilos comprenden una especie hidrófila.

Generalmente, cada polímero puede ser un homopolímero (derivado de la polimerización de un único tipo de monómero - que tiene esencialmente la misma composición química) o un copolímero (derivado de la polimerización de dos o más monómeros diferentes - que tienen composiciones químicas diferentes). Los polímeros que son copolímeros incluyen cadenas de copolímeros aleatorias o cadenas de copolímeros en bloque (p. ej., copolímero dibloque, copolímero tribloque, copolímero de bloque de orden superior, etc.). Cualquier cadena de copolímero de bloque dada puede configurarse convencionalmente y efectuarse según métodos conocidos en la técnica. Generalmente, cada polímero puede ser un polímero lineal, o un polímero no lineal. Los polímeros no lineales pueden tener diversas arquitecturas, incluyendo, por ejemplo, polímeros ramificados, polímeros en cepillo, polímeros en estrella, polímeros en dendrímero, y pueden ser polímeros reticulados, polímeros semireticulados, polímeros injertados, y combinaciones de los mismos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "unión", "que une", "unificación" o " fusión" se refiere a una interacción directa entre la membrana y/o los constituyentes de la membrana de uno o más EDEM y BDM. El término "interacciones directas" puede referirse a una agregación simple, intercambio de lípidos, ruptura estructural, hemifusión y fusión. Los términos "hemifusión" y "fusión" se refieren al mezclado parcial o completo de los componentes de las membranas del BDM y EDEM y a la formación de un espacio interno común que comprende el material contenido originalmente en cada uno de los BDM/EDEM que forman la partícula fusionada (p. ej., agente activo, proteína o ácido nucleico endógeno). El término "eficiencia de la fusión" se refiere a la cantidad relativa de híbridosomas generada a partir de EDEM y BDM que se someten a fusión.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "membrana" se refiere a una "cubierta" que comprende moléculas alifáticas tales como ácidos grasos, moléculas o polímeros de lípidos y que encierra un compartimento interno. Como tal, este término puede usarse para definir la membrana de una nanopartícula de lípido, de un polimersoma, de una partícula secretada naturalmente, o de cualquier tipo de célula, incluyendo células bacterianas, fúngicas, de plantas, de animales o 5 humanas (p. ej., células epiteliales). El término membrana también incluye bicapas lipídicas intracelulares tales como, por ejemplo, membranas endosómicas o lisosomales, así como membranas nucleares.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que los híbridosomas presentan varias ventajas sobre los otros vehículos farmacéuticos conocidos en la técnica, que se obtienen por la unión física de los EDEM con los BDM y que sinergizan las 10 ventajas presentadas por cada uno de estos módulos. Por otra parte, los EDEM pueden diseñarse para tener propiedades físico-químicas definidas de manera precisa, fusogenicidad ajustable, altas eficiencias de encapsulación para un rango amplio de agentes activos, aguantar entornos extremos necesarios para la química de conjugación y cumplir con los requerimientos de la fabricación clínica. Por otra parte, los BDM tienen perfiles seguros de toxicidad e inmunogenicidad, muestran una especificidad innata para una diana (p. ej., una célula, tejido u órgano) y se optimizan respecto a las 15 propiedades de circulación del organismo. Por lo tanto, el híbridosoma tiene un interés particular para aplicaciones en terapia, imagenología y diagnóstico. Una amplia variedad de agentes activos puede encapsularse fácilmente *in vitro* en los EDEM, y mediante la unión de dichos EDEM con BDM específicos que se originan del sujeto, se genera un híbridosoma biocompatible personalizado que incluye los agentes activos. El híbridosoma también puede presentar una o más de las 20 siguientes ventajas: (a) una reducción del secuestro por los macrófagos del sistema reticuloendotelial (RES); (b) una reducción de la respuesta del sistema inmune; (c) un tiempo de vida en circulación incrementado; (d) la administración con direccionamiento específico y potenciado; y (e) un incremento en los efectos terapéuticos y/o de monitorización.

Ventajosamente, las dimensiones del híbridosoma pueden personalizarse de manera se ajusten a aplicaciones muy específicas y dirigidas. Por consiguiente, las características estructurales específicas de los EDEM y los BDM usados para producir el híbridosoma pueden seleccionarse de manera que se facilite la distribución del híbridosoma en tejidos diana. Por ejemplo, con el fin de tomar como diana tejidos de tumores sólidos, uno o más de los módulos básicos (EDEM o BDM) 25 puede seleccionarse de manera que las dimensiones del híbridosoma resultante sean menores que los huecos fenestrados encontrados en la vasculatura "con escape" en los tumores sólidos. De esta manera, este híbridosoma personalizado puede extravasarse fácilmente a través de las fenestraciones de la vasculatura y dirigirse directamente a las células tumorales desde el espacio intersticial. De forma similar, con el fin de tomar como diana los hepatocitos, uno o más de los 30 módulos básicos puede seleccionarse/prepararse por ingeniería de manera que el híbridosoma resultante sea menor que las fenestraciones de la capa endotelial que reviste los sinusoides hepáticos en el hígado. De esta manera, el híbridosoma sería capaz de penetrar las fenestraciones endoteliales para alcanzar los hepatocitos diana. A la inversa, el híbridosoma puede diseñarse de una manera tal que sus dimensiones limitarán o evitarán su distribución a determinadas células o tejidos. Por ejemplo, el híbridosoma tiene un tamaño comprendido entre 20 y 800 nm, preferiblemente entre 50 y 400 nm, y más preferiblemente entre 100 y 200 nm.

35 Por ejemplo, el BDM y/o el EDEM usado para generar el híbridosoma comprende uno o más de endocitosis mediada por receptor, endocitosis mediada por clatrina y mediada por caveolas, fagocitosis y macropinocitosis, fusogenicidad, disrupción endosómica o lisosomal y/o propiedades de liberación que rinden dichas ventajas para los híbridosomas respecto a otros sistemas de administración clasificados de forma similar.

40 La citotoxicidad y/o biocompatibilidad del EDEM usado se reducen mediante la selección específica de los lípidos comprendidos en su o sus bicapas lipídicas, aumentando además de esta manera la biocompatibilidad del híbridosoma resultante. Por lo tanto, el EDEM carece de lípidos de transfección tóxicos tales como Lipofectamina e HiPerFect, que se reemplazan ventajosamente por uno o más lípidos catiónicos ionizables tales como DLinDMA, DLin-KC2-DMA y/o Dlin-MC3-DMA. Los lípidos catiónicos ionizables pueden usarse como el único lípido ionizable del EDEM (p. ej., iLNP) o pueden combinarse con lípidos auxiliares y/o lípidos modificados con PEG.

45 Como se ha mencionado anteriormente, el uso de los EDEM como un componente del híbridosoma ofrece ventajas sustanciales: (1) los EDEM pueden producirse por métodos a gran escala y pueden producirse cantidades sustanciales del o de los agentes activos encapsulados; (2) la eficiencia de la encapsulación del agente activo es alta; (3) el tamaño de los EDEM fabricados puede controlarse de manera que los híbridosomas resultantes pueden producirse con un tamaño terapéuticamente óptimo; (4) debido al hecho de que los EDEM se producen *in vitro*, alguna característica estructural 50 específica puede mantenerse con el fin de facilitar la separación de las subpopulaciones no unidas; (5) los EDEM son capaces de aguantar entornos extremos necesarios para la química de conjugación; y (6) los EDEM tienen una fusogenicidad ajustable. Como varios EDEM pueden unirse con uno o más BDM, puede ser posible generar separadamente EDEM que encapsulan distintos agentes activos (que no podrían encapsularse conjuntamente por alguna razón, tal como una solubilidad diferente en disolvente etc.) y después unir cada uno de dichos EDEM distintos con uno o más BDM, generando de esta manera un híbridosoma que comprende todos los agentes activos deseados.

El EDEM puede modificarse con un resto de direccionamiento y/o un resto estabilizador.

- Los EDEM presentan una estabilidad física y química aumentada en comparación con las subunidades de BDM. Por consiguiente, mientras los BDM muestran una buena estabilidad en un entorno fisiológico, los EDEM son capaces de aguantar los entornos versátiles requeridos para la química de conjugación e inserciones posteriores. Por ejemplo, los EDEM pueden preservar la estabilidad cuando se ponen en contacto con agentes reductores (p. ej., ditiotreitol (DTT)).
- 5 Conjuntamente con su estabilidad aumentada, la presente invención contempla la modificación de las superficies de los EDEM por el uso de excipientes adicionales. En una realización, el término "modificado" puede usarse para caracterizar un EDEM modificado respecto al EDEM fabricado a partir del que se preparó el EDEM modificado. Por consiguiente, "modificado" también puede hacer referencia a cambios en formulaciones de EDEM ya que las composiciones de EDEM pueden estar enriquecidas con restos fusogénicos o lípidos catiónicos, no catiónicos y modificados con PEG adicionales para tomar como diana además tejidos o células.
- 10 Los EDEM pueden prepararse para impartir un direccionamiento preferente de los híbridosomas a tejidos, células u órganos específicos, tales como el corazón, pulmones, riñones y/o cerebro. Por ejemplo, los EDEM tales como las iLNP pueden prepararse para conseguir una administración aumentada a las células y tejidos diana.
- 15 Tal y como se usa en la presente memoria, "restos de direccionamiento" son excipientes que pueden unirse (bien covalentemente o no covalentemente) *in vitro* al EDEM para estimular la interacción del híbridosoma con determinadas células diana o tejidos diana. Tal y como se usa en esta descripción, "unido" o "conjugado" significa que dos entidades (aquí, un resto de direccionamiento y una vesícula vehicular) están asociadas con una afinidad suficiente como para que se lleve a cabo el beneficio terapéutico/de diagnóstico de la asociación entre las dos entidades. Por ejemplo, el direccionamiento puede estar mediado por la inclusión de uno o más ligandos de direccionamiento (p. ej., anticuerpo monoclonal) en el interior o en el híbridosoma para estimular la administración a las células o tejidos diana. El reconocimiento del ligando de direccionamiento por los tejidos diana facilita activamente la distribución tisular y la captación celular del contenido del híbridosoma por las células y tejidos diana. Los ligandos adecuados se seleccionan sobre la base de sus propiedades físicas, químicas o biológicas (p. ej., afinidad y/o reconocimiento selectivo de marcadores o características de la superficie de la célula diana).
- 20 25 Los ligandos de direccionamiento se seleccionan de manera que se explotan las características únicas de una célula diana, permitiendo así que el híbridosoma discrimine entre las células diana y no diana. Dichos restos de direccionamiento pueden incluir, pero no están limitados a, cualquier miembro de una pareja de unión específica, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, así como derivados o análogos de los mismos, incluyendo fragmentos de dominio variable (Fv), fragmentos de cadena única Fv (scFv), fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos de dominio único; fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpo; versiones multivalentes de los anteriores.
- 30 35 En la presente memoria se contemplan híbridosomas que comprenden uno o más ligandos (p. ej., péptidos, aptámeros, oligonucleótidos, una vitamina u otras moléculas) que son capaces de aumentar la afinidad de las composiciones a una o más células o tejidos diana. El ligando de direccionamiento puede abarcar la superficie de una nanopartícula de lípido (p. ej., un glicosaminoglicano), estar incluido o estar encapsulado en el híbridosoma. Los híbridosomas incluyen reactivos de unión multivalentes incluyendo, sin limitación: anticuerpos mono específicos o biespecíficos, tales como fragmentos Fv estabilizados por disulfuro, tándems de fragmentos scFv (fragmentos (SCFV)2), diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos, que son típicamente fragmentos scFv unidos covalentemente o estabilizados de otra manera (es decir, estabilizados por cremallera de leucina o hélice); y otros restos de direccionamiento incluyen, por ejemplo, aptámeros, receptores, y proteínas de fusión.
- 40 45 50 El híbridosoma puede utilizarse para regímenes de afinidad multiespecíficos. En los mismos, el híbridosoma comprende al menos dos restos de direccionamiento distintos unidos covalentemente a la superficie del híbridosoma. El primer resto de direccionamiento se une específicamente a un antígeno o molécula en la superficie de la célula (es decir, antígeno de la superficie de la célula), y el segundo resto de direccionamiento se une a una diana intracelular. El primer resto de direccionamiento y el segundo resto de direccionamiento pueden estar incluidos en una única cadena de polipéptido. Algunos o todos los restos de direccionamiento pueden estar compuestos por aminoácidos (incluyendo aminoácidos naturales, no naturales, y modificados), ácidos nucleicos y aptámero o sacáridos. Un resto de direccionamiento puede ser una molécula pequeña. El resto de direccionamiento intracelular es exógeno y está conjugado con el EDEM mientras el resto de direccionamiento extracelular está presente en el BDM y se produce *in vivo*. El resto de direccionamiento intracelular generado *in vivo* puede estar presente en el BDM mientras un resto de direccionamiento extracelular se conjuga con el EDEM.
- 55 El "primer resto de direccionamiento" puede ser un anticuerpo, molécula semejante a anticuerpo, péptido, o una molécula pequeña, tal como vitaminas, p. ej., folato, azúcares tales como lactosa y galactosa, u otras moléculas pequeñas. El antígeno de la superficie de la célula puede ser cualquier molécula de la superficie de la célula que experimenta internalización, tal como una proteína, azúcar, grupo de cabeza de un lípido u otro antígeno en la superficie de la célula. Los ejemplos de antígenos de la superficie de la célula incluyen, pero no están limitados a, las tetraspaninas, el receptor

de EGF, HER2/Neu, receptores de VEGF, integrinas, CD38, CD33, CD19, CD20, CD22 y el receptor de asialoglicoproteína.

El "segundo resto de direccionamiento" reconoce una diana intracelular. Este resto de direccionamiento se une específicamente a una superficie o antígeno de membrana intracelular, tal como una proteína. En determinados aspectos, un resto de direccionamiento intracelular aumentará la localización de una sustancia en una localización intracelular deseada. El segundo resto de direccionamiento puede ser proteináceo y puede ser un anticuerpo o molécula semejante a anticuerpo. Otros segundos restos de direccionamiento incluyen péptidos, tales como, por ejemplo, los análogos peptídicos de melitina sintéticos, y macromoléculas orgánicas que, gracias a su tamaño (un peso molecular de >500 g), carga, u otras propiedades físico-químicas, son incapaces o poco capaces de entrar en las células independientemente. El segundo resto de direccionamiento puede ser un aptámero de ácido nucleico. El segundo resto de direccionamiento puede unirse a proteínas citosólicas; proteínas unidas a la cara interna de la membrana plasmática, o a la membrana nuclear, mitocondrial u otras membranas en la célula; o proteínas nucleares o proteínas en otros compartimentos subcelulares. Será evidente para los expertos en la técnica que el resto de direccionamiento que bloquea funciones críticas de la señalización intracelular será un buen candidato para su uso como segundos restos de direccionamiento. Los segundos restos de direccionamiento pueden inhibir directamente la actividad de una proteína, o bloquear una interacción con un sustrato de la proteína, o pueden bloquear las interacciones proteína-proteína.

Es posible incorporar restos de direccionamiento funcionales complementarios para el aumento del transporte intracelular activo del híbridsoma. Un ejemplo para un transporte intracelular aumentado se consigue empleando restos de direccionamiento capaces de "secuestrar", unirse a o conectarse con sistemas de transporte celular activos naturales. Por ejemplo, la unión de una de estas proteínas del complejo motor de microtúbulos con un péptido de unión a la proteína motora permite el transporte activo a lo largo de la red de transporte de los microtúbulos. Las proteínas motoras ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, dineína y quinesina.

El segundo resto de direccionamiento puede poseer un papel doble, concretamente capacidades de penetración de la membrana y funcionalidades de direccionamiento intracelular. Por ejemplo, el péptido melitina o análogos del mismo poseen una capacidad de interacción con la membrana a pH bajo y una funcionalidad de direccionamiento nuclear en el citosol. Este papel doble puede atribuirse a un segmento del segundo resto de direccionamiento. Por ejemplo, las funciones de direccionamiento nuclear mediadas a través de secuencias de localización nuclear (p. ej., secuencia de péptido "KRKR") y los segmentos anfipáticos de hélice  $\alpha$  contenidos en el mismo segundo resto de direccionamiento. Por lo tanto, el papel doble de un segundo resto de direccionamiento puede mediar dos funciones complementarias en el híbridsoma. Las composiciones de híbridsoma ejemplares modificadas con un segundo resto de direccionamiento con propósito doble se describen en los Ejemplos más adelante.

Además, los EDEM podrían modificarse para presentar moléculas con propiedades anfipáticas, tales como péptidos que penetran en la célula en su superficie. Estos péptidos se caracterizan por su capacidad de alterar la integridad de la bicapa de la membrana, bien por la creación de defectos, disrupción, o a través de la formación de poros, dando lugar a una interacción entre los EDEM y los BDM. Los ejemplos de dichos péptidos pueden derivarse de proteínas, tales como Tat y Rev, así como péptidos derivados de toxinas tales como crotamina o melitina. Una clase preferida de péptidos que penetran en las células incluye dominios hidrófobos que son "inertes" a pH fisiológico, pero que son activos en el entorno de un pH bajo. Después del desplegamiento y exposición del dominio hidrófobo inducidos por el pH, el resto se une a las bicapas lipídicas y efectúa la interacción entre los EDEM y los BDM o híbridsomas y los compartimentos endosómicos. La conjugación ejemplar de un péptido fusogénico se describe en los Ejemplos más adelante.

En la presente memoria también se contempla la incorporación de moléculas funcionales complementarias quimioselectivas y bioortogonales en o sobre los EDEM para aumentar la unión específica de sitio con los BDM. Por ejemplo, la incorporación de péptidos de fusión en la bicapa lipídica de los EDEM, tales como proteínas SNARE (receptores para proteínas de unión a factor sensible a N-etyl maleimida soluble) o miméticos sintéticos de los mismos, permite una interacción específica de receptor entre los EDEM y los BDM.

Para facilitar la conjugación de restos de direccionamiento en el EDEM, una porción de la relación molar de lípido modificado con PEG puede sustituirse por lípidos modificados con PEG con una entidad funcional tal como un grupo maleimida (p. ej., 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida(poliétilen glicol)-2000]) o amina (p. ej., 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(poliétilen glicol)-2000]) en el extremo distal del PEG. Los métodos de conjugación ejemplares se describen en los Ejemplos más adelante.

Los EDEM descritos en la presente memoria pueden comprender además un resto de escudo anclado en la bicapa lipídica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "resto estabilizador" se refiere a una molécula que puede modificar las propiedades de superficie del híbridsoma a través del componente EDEM incluido en el mismo. Un resto estabilizador puede prevenir que el híbridsoma se adhiera entre sí o se adhiera a las células sanguíneas o a las paredes vasculares. En determinados aspectos, los híbridsomas con restos estabilizadores tienen una inmunogenicidad reducida cuando se

administran a un sujeto. Los restos estabilizadores también pueden incrementar el tiempo en la circulación sanguínea de los híbridosomas en un sujeto. Los restos estabilizadores pueden incluir aquellos generalmente muy conocidos en la técnica.

5 Los ejemplos de restos estabilizadores incluyen, pero no están limitados a, compuestos que comprenden polietilen glicol y otros compuestos tales como, pero no están limitados a, dendrímeros, óxido de polialquíleno, polivinil alcohol, policarboxilato, polisacáridos, y/o almidón hidroxialquilado, que reducen la interacción o unión del complejo a especies presentes *in vivo* o *in vitro*, tales como proteína del complemento del suero, cofactores, hormonas o vitaminas. El término "lípido modificado con PEG" se refiere a, pero no está limitado a, una cadena de polietilen glicol de hasta 20 kDa de longitud, conjugada covalentemente a un lípido con cadena(s) alquila de C6-C20 de longitud. Los polietilen glicol-lípidos adecuados incluyen fosfatidiletanolamina modificada con PEG (PEG-PE), ceramidas modificadas con PEG (p. ej., PEG-CerC20), dialquilaminas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG y dialquilgliceroles modificados con PEG. El polietilen glicol-lípido puede ser (Metoxi Polietilen Glicol)2000-dimiristolglicerol (PEG-s-DMG). Los ejemplos no limitativos adicionales de lípidos modificados con PEG incluyen PEG-dialquioxipropilo (DAA), R-3-[ $\omega$ -metoxi-poli(etilen glicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristoxipropil-3-amino (PEG-c-DOMG) y N-Acetilgalactosamina-((R)-2,3-bis(octadeciloxi)propil-l-metoxi poli(etilen glicol)2000)propilcarbamato) (GalNAc-PEG-DSG).

El PEG puede presentarse en la superficie del EDEM, BDM y/o híbridosomas, pueden usarse compuestos distintos de lípidos, tales como, por ejemplo, péptidos, anclajes hidrófobos o polímeros, carbohidratos, metales u otros iones para conjugarse con PEG para anclar estos compuestos en la bicapa lipídica.

20 Volviendo a los BDM, las moléculas bioactivas en el citosol y en la membrana plasmática pueden incorporarse durante la génesis de los BDM, dando lugar a BDM que tienen propiedades funcionales únicas que permiten utilizar los BDM como vehículos de nanopartículas efectivos de agentes activos. A este respecto, los BDM son capaces de administrar un agente activo a las células y tejidos diana, mientras se retiene la actividad biológica de la carga endógena, así de como los agentes activos. En particular, los BDM muestran una semivida en suero optimizada evolutivamente e interacción con los tejidos y/o células diana. La capacidad de administración ventajosa de uno o más BDM se transfiere al híbridosoma después de la unión de los BDM con uno o más EDEM. Además, los BDM son capaces de transferir componentes bioactivos endógenos al híbridosoma. Uno o más BDM pueden recogerse y usarse para estimular la liberación del miARN, polinucleótidos y polipéptidos endógenos producidos *in vivo* por células donantes, en el volumen encerrado por el híbridosoma. Uno o más BDM pueden recogerse y usarse para estimular la transferencia moléculas y/o polipéptidos bioactivos incluidos en la membrana del BDM como constituyentes de la membrana del híbridosoma.

30 Los BDM usados en el proceso de la invención pueden derivar de un sujeto donante que padece una enfermedad o un trastorno, tal como cáncer. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, se espera que al menos algunos de los BDM recogidos del sujeto tenga la capacidad de tomar como diana específicamente las células asociadas con dicha enfermedad o trastorno, y, por lo tanto, pueda usarse ventajosamente para monitorizar o tratar la enfermedad. Además, los componentes de los BDM usados en el proceso de la invención pueden interaccionar con células específicas y facilitar la endocitosis, permitiendo de esta manera la administración dirigida del material encapsulado a una célula, tipo de célula, o tejido específico. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, la especificidad por la célula diana de los BDM usados en el proceso de la invención depende del tipo de célula del que deriva el BDM. Por ejemplo, los BDM derivados de células B o de células de glioblastoma pueden usarse para producir los híbridosomas. Dichos BDM pueden transferir uno o más restos de direccionamiento endógenos de células B o de glioblastoma producidos *in vivo* al híbridosoma, haciendo de esta manera que el híbridosoma sea específico para células B o glioblastoma. También, se espera que el híbridosoma reintroducido en el sujeto del que deriva el BDM usado para producir el híbridosoma, los componentes del BDM transferidos al híbridosoma lo vuelvan compatible con el sistema inmune de dicho sujeto.

45 La célula de la que puede derivar el BDM es una célula tumoral. La célula tumoral puede ser una célula tumoral primaria, o puede producirse a partir de una célula tumoral p. ej., por subcultivo, cultivo, expansión, inmortalización, etc. Así, la célula tumoral puede ser de un tumor en un paciente con cáncer o precáncer, o puede ser de una línea de células tumorales o cancerosas. La célula tumoral puede ser de un tumor benigno o de un tumor maligno.

La célula de la que puede derivar el BDM es una célula infectada, es decir, una célula que contiene un patógeno.

50 La célula de la que puede derivar el BDM es una célula mutada. Por ejemplo, la célula mutada expresa proteínas mutantes o con plegamiento erróneo. La célula mutada puede sobreexpresar una o más proteínas. La célula mutante puede estar implicada en un trastorno degenerativo, tal como un trastorno a proteopático. La célula puede ser una célula del sistema nervioso central.

Una composición farmacéutica puede comprender un híbridosoma que no contiene ningún agente terapéutico y/o agente de diagnóstico en su compartimento externo. Dicho híbridosoma puede producirse, por ejemplo, uniendo un EDEM "vacío"

- con un BDM. El EDEM "vacío" puede comprender algún elemento estructural en su membrana que facilitaría la carga adicional de agentes activos a través de una técnica conocida en la técnica (p. ej., electroporación).
- Tal y como se usa en la presente memoria, "agente activo" o "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto o mezcla de compuestos que produce un resultado fisiológico, p. ej., un resultado beneficioso o útil, después de ponerse en contacto con un organismo vivo, p. ej., un mamífero, tal como un ser humano. Los agentes activos se pueden distinguir de otros componentes de las composiciones de administración, tales como vehículos, diluyentes, aglutinantes, colorantes, etc. El agente activo puede ser cualquier molécula, así como una porción de unión o fragmento de la misma, que sea capaz de modular un proceso biológico en un sujeto vivo. El agente activo puede ser una sustancia usada en el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad o como un componente de una medicación. Un agente activo puede hacer referencia a un compuesto que facilita la obtención de información de diagnóstico acerca de un sitio diana en un cuerpo de un organismo vivo, tal como un mamífero o en un ser humano. Por ejemplo, los agentes de imagenología pueden clasificarse como agentes activos ya que son sustancias que proporcionan información por imagenología requerida para el diagnóstico.
- El hibridosoma de la composición puede comprender uno o más agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico. Como se ha descrito anteriormente, estos agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico se encapsulan en primer lugar en un EDEM y entonces se transfieren al compartimento interno del hibridosoma uniendo dicho EDEM con un BDM.
- Tal y como se usa en la presente memoria, un "agente terapéutico" es una sustancia fisiológicamente o farmacológicamente activa que puede producir un efecto biológico deseado en un sitio diana en un animal, tal como un mamífero o en un ser humano. El agente terapéutico puede ser cualquier compuesto inorgánico u orgánico. Un agente terapéutico puede disminuir, suprimir, atenuar, bajar, parar, o estabilizar el desarrollo o progresión de una enfermedad, trastorno, o crecimiento celular en un animal tal como un mamífero o un ser humano. Los ejemplos incluyen, sin limitación, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos (incluyendo ARNsi, miARN y ADN), polímeros, y moléculas pequeñas. Los agentes terapéuticos pueden estar caracterizados o no caracterizados.
- Un agente terapéutico puede estar presente en el EDEM o en el BDM antes de unir los dos. Los BDM pueden contener uno o más agentes terapéuticos (p. ej., miARN) endógenos para la célula de la que deriva el BDM y los EDEM pueden comprender uno o más agentes terapéuticos (p. ej., agente antineoplásico) antes de su unión con un BDM. Los métodos para encapsular agentes activos en los EDEM son conocidos en la técnica (Bao, Mitragotri, y Tong, 2013). Un hibridosoma puede cargarse con un agente terapéutico después de la unión de los EDEM y los BDM, mediante unión covalente y no covalente a la superficie de la célula, después de la inserción en la membrana del hibridosoma o a través de la apertura de poros en la membrana del hibridosoma para permitir que los agentes activos entren en el volumen encapsulado (p. ej., electroporación).
- Los agentes terapéuticos también pueden estar en diversas formas. Dichas formas incluyen, sin limitación, moléculas inalteradas, complejos moleculares, y sales farmacológicamente aceptables (p. ej., hidrocloruro, hidrobromuro, sulfato, fosfato, nitrito, nitrato, borato, acetato, maleato, tartrato, oleato, salicilato, y similares). Los agentes terapéuticos pueden modificarse con sales de metales, aminas o cationes orgánicos (p. ej., amonio cuaternario). Los derivados de fármacos, tales como bases, ésteres y amidas también pueden usarse como un agente terapéutico. Un agente terapéutico que es insoluble en agua puede usarse en una forma que sea un derivado soluble en agua del mismo, tal como un derivado de base. En dichos casos, el derivado del agente terapéutico puede convertirse en la forma terapéuticamente activa original después de su administración a un sitio diana. Dichas conversiones pueden ocurrir por diversos procesos metabólicos, incluyendo escisión enzimática, hidrólisis por el pH del cuerpo, o por otros procesos similares.
- Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, sin limitación, agentes quimioterapéuticos (es decir, agentes antineoplásicos), agentes anestésicos, bloqueantes beta-adrenérgicos, agentes antihipertensores, agentes antidepresivos, agentes anticonvulsionantes, agentes antieméticos, agentes antihistamínicos, agentes antiarrítmicos, agentes antipalúdicos, agentes antiproliferativos, agentes antivascularización, agentes para la reparación de heridas, agentes para la reparación de tejidos, agentes de terapia térmica, y combinaciones de los mismos.
- Los agentes terapéuticos adecuados también pueden ser, sin limitación, agentes inmunosupresores, citoquinas, agentes citotóxicos, compuestos nucleolíticos, isótopos radiactivos, receptores, y enzimas activadoras de profármacos. Los agentes terapéuticos pueden secretarse naturalmente o producirse por métodos sintéticos o recombinantes, o cualquier combinación de los mismos.
- Puede usarse un amplio espectro de agentes terapéuticos en conjunción con los EDEM descritos en la presente memoria. Los ejemplos no limitativos de dichos agentes terapéuticos incluyen agentes antineoplásicos, agentes antiinfectivos, anestésicos locales, antialérgicos, antianémicos, inhibidores de la angiogénesis, bloqueantes beta-adrenérgicos, antagonistas del canal de calcio, agentes antihipertensores, antidepresivos, anticonvulsionantes, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antireumáticos, anthelminticos, agentes antiparasitarios, corticosteroides, hormonas,

antagonistas de hormonas, inmunomoduladores, antagonistas de neurotransmisores, agentes antidiabéticos, antiepilépticos, antihemorrágicos, antihipertónicos, agentes antiglaucoma, citoquinas inmunomoduladoras, sedantes, quimioquinas, vitaminas, toxinas, narcóticos, agentes derivados de plantas (p. ej., de extractos de hojas, raíces, flores, semillas, tallos o ramas) y combinaciones de los mismos.

- 5 Los fármacos que están afectados por la resistencia a múltiples fármacos clásica pueden tener una utilidad particular como agentes terapéuticos. Dichos fármacos incluyen, sin limitación, alcaloides de vinca (p. ej., vinblastina), las antraciclinas (p. ej., doxorrubicina) e inhibidores de la transcripción del ARN.

El agente terapéutico puede ser un agente para la quimioterapia del cáncer. Los ejemplos de agentes para la quimioterapia del cáncer adecuados incluyen, sin limitación: mostazas de nitrógeno, nitrosorueas, etilenimina, sulfonatos de alcano, tetrazina, compuestos de platino, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, análogos de folato, antraciclinas, taxanos, alcaloides de vinca, e inhibidores de topoisomerasa y agentes hormonales.

10 Los fármacos para la quimioterapia del cáncer adicionales que pueden usarse como agentes terapéuticos incluyen, sin limitación: agentes alquilantes, tales como ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo; aziridinas; etileniminas y metilmelaminas; antimetabolitos; análogos de pirimidina; antiadrenérgicos; reponedor de ácido fólico; ácido retinoico; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

15 Los agentes terapéuticos adicionales que son adecuados incluyen, sin limitación, agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en los tumores. Los ejemplos no limitativos de dichos agentes antihormonales incluyen antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno y toremifeno; antiandrógenos, tales como leuprórido y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

20 También pueden usarse citoquinas como agentes terapéuticos. Los ejemplos no limitativos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Los ejemplos adicionales incluyen hormonas de crecimiento, tales como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionilo, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento semejante a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y CSF de granulocitos (GCSF); interleuquinas (IL); factores de necrosis tumoral, tales como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Tal y como se usa en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes (p. ej., de cultivos de células T y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa).

35 El agente terapéutico también puede ser un agente terapéutico basado en anticuerpo, los ejemplos no limitativos incluyen Herceptina, Eribitux, Avastina, Rituxán, Simulect, Enbrel, Adalimumab, y Remicade.

40 El agente terapéutico puede ser una nanopartícula. Los ejemplos no limitativos de dichas nanopartículas incluyen cualquier nanopartícula basada en metal y semiconductor, que incluye, pero no está limitado a: oro, plata, óxido de hierro, puntos cuánticos o nanotubos de carbono. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la nanopartícula puede ser una nanopartícula que puede usarse para una ablación térmica o una terapia térmica.

45 El EDEM puede cargarse con agentes terapéuticos aniónicos. Los agentes terapéuticos aniónicos incluyen cualquier agente terapéutico con una carga negativa neta, o que tiene un grupo cargado negativamente que es capaz de interaccionar con un lípido ionizable del hibridosoma. Dichos agentes terapéuticos incluyen cualquier agente terapéutico conocido o potencial, incluyendo fármacos y compuestos tales como, pero no limitado a, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos modificados (incluyendo proteína-ácidos nucleicos y similares), proteínas y péptidos con grupos con carga negativa, fármacos convencionales tales como alcaloides de plantas y análogos que tienen grupos con carga negativa, y similares. Los agentes terapéuticos que no son de forma inherente aniónicos pueden derivatizarse con grupos aniónicos para facilitar su uso. Por ejemplo, el paclitaxel puede derivatizarse con un grupo de ácido poliglutámico.

50 El hibridosoma puede comprender ácidos nucleicos cargados negativamente para ser introducidos en células. Los ejemplos no limitativos de ácidos nucleicos son ARNsi, micro ARN (miARN), ARN pequeño o corto en horquilla (ARNsh), ARN guía (ARNg), ARN con repetición palindrómica corta interespaciada regularmente agrupada (ARNcr), ARN con repetición palindrómica corta interespaciada regularmente agrupada con activación en trans (ARNtracr) oligonucleótidos inmunoestimulantes, plásmidos, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas. Los ácidos nucleicos contenidos en un

hibridosoma pueden ser endógenos para la célula de la que se derivó el BDM y/o un ácido nucleico exógeno encapsulado por el EDEM.

5 Los polinucleótidos encapsulados por el hibridosoma pueden codificar un ARN de interferencia pequeño (ARNsi) o ARN antisentido para el propósito de modular o disminuir o eliminar de otra forma la expresión de un ácido nucleico o gen endógeno. Dichos polinucleótidos encapsulados pueden tener una naturaleza natural o recombinante y pueden ejercer su actividad terapéutica usando mecanismos de acción con sentido o antisentido (p. ej., mediante la modulación de la expresión de un gen o ácido nucleico diana). Tal y como se usa en la presente memoria, el término "modular" se refiere a alterar la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Modular puede significar incrementar o potenciar, o puede significar disminuir o reducir.

10 El hibridosoma puede comprender polinucleótidos que codifican polipéptidos o proteínas de interés, tales como una hormona, enzima, receptor, o péptidos moduladores. El hibridosoma puede comprender agentes bioactivos que, después de la transfección, son capaces de producir polipéptidos funcionales que pueden facilitar el direccionamiento/transfección de hibridosoma adicional a las células diana. Los hibridosomas descritos en la presente memoria pueden emplear una estrategia multifuncional para facilitar la administración de materiales encapsulados (p. ej., uno o más polinucleótidos) y la liberación posterior cuando interactúan con una célula diana.

15 Típicamente, una composición farmacéutica para uso como una vacuna para un tipo de cáncer particular comprenderá BDM derivados de células tumorales/cancerosas de ese tipo de cáncer particular. Por ejemplo, una composición farmacéutica para uso en una vacuna para cáncer de glioblastoma comprende típicamente BDM purificados de células tumorales/cancerosas de glioblastoma. De esta manera, el BDM comprende antígenos asociados con tumor que estimulan una respuesta inmune adaptativa frente a los antígenos presentes en las células tumorales/cancerosas frente a las que se busca tratamiento/protección. La misma concordancia de origen/intención se aplica a otras enfermedades.

20 25 Los BDM pueden ser cualquier vesícula proteoliposómica obtenida por la disruptión de, o formación de vacuolas, en una membrana externa bacteriana o de parásito para formar vesículas que retienen los antígenos de la membrana externa (véase la Pub Internacional No. WO2014122232 y WO201108027). Los BDM derivados de bacterias y parásitos tienen varias propiedades que los hacen candidatos atractivos para las plataformas de administración de inmunoterapia incluyendo: (i) inmunogenicidad fuerte, (ii) capacidad adyuvante propia, (iii) capacidad de interactuar con células de mamífero y ser captados a través de la fusión de membranas o por la unión a células a través de receptores de adhesión, y (iv) la posibilidad de incorporar la expresión de antígenos heterólogos por ingeniería recombinante.

30 Una composición farmacéutica que comprende el hibridosoma y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede usarse, por lo tanto, para el tratamiento o profilaxis de diversas enfermedades y trastornos.

35 Tal y como se usa en la presente memoria, "agente de diagnóstico" se refiere a un componente que puede detectarse en un sujeto o muestra de ensayo y se describe adicionalmente en la presente memoria. Los agentes de diagnóstico pueden ser sustancias que proporcionen información de imagenología acerca de un sitio diana en un cuerpo de un animal, tal como un mamífero o en un ser humano. Un agente de diagnóstico puede incluir cualquier agente de diagnóstico conocido en la técnica.

40 45 Un agente de diagnóstico puede detectarse por una variedad de maneras, incluyendo como un agente que proporciona y/o aumenta una señal detectable que incluye, pero no está limitado a, señales de emisión gamma, radioactivas, ópticas, absorbentes fluorescentes, ecogénicas, magnéticas o de tomografía. Las técnicas para imagenología del agente de diagnóstico pueden incluir, pero no están limitadas a, tomografía computerizada (CT), imagenología de resonancia magnética (MRI), imagenología óptica, tomografía computerizada de emisión de un fotón (SPECT), tomografía de emisión de positrones (PET), imagenología de rayos x, imagenología de rayos gamma, y similares.

50 Un radioisótopo puede actuar como un agente de diagnóstico y ser incorporado en el hibridosoma y puede incluir radionúclidos que emiten rayos gamma, positrones, partículas beta y alfa, y rayos X. Los radionúclidos adecuados incluyen, pero no están limitados a, <sup>225</sup>Ac, <sup>72</sup>As, <sup>211</sup>At, <sup>11</sup>B, <sup>128</sup>Ba, <sup>212</sup>Bi, <sup>75</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>14</sup>C, <sup>109</sup>Cd, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>18</sup>F, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>3</sup>H, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>130</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>212</sup>Pb, <sup>103</sup>Pd, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>47</sup>Sc, <sup>153</sup>Sm, <sup>89</sup>Sr, <sup>99m</sup>Tc, <sup>88</sup>Y y <sup>90</sup>Y.

55 La carga útil puede ser un agente detectable, tal como, pero no limitado a, diversas moléculas pequeñas orgánicas, compuestos inorgánicos, nanopartículas, enzimas o sustratos de enzimas, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes (p. ej., luminol), materiales bioluminiscentes (p. ej., luciferasa, luciferina, y acuorina), materiales quimioluminiscentes). Dichos marcadores ópticamente detectables incluyen, por ejemplo, sin limitación, octadecil rodamina B, ácido 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il, 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilben-2,2' disulfónico, acridina y derivados, ácido 5-(2'-aminoethyl)aminonafalalen-1-sulfónico (EDANS), sal de dilitio de 4-Amino-N-(3-[vinilsulfoni]fenil)naftalimida-3,6-disulfonato, N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, BODIPY, Amarillo Brillante, cumarina y derivados, colorantes de cianina, cianosina, 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), Bromopirogalol Rojo, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, dietilentriamina pentaacetato, ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estileno-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-

- 5 diisotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico, cloruro de dansilo, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC), eosina y derivados, eritrosina y derivados, etidio, fluoresceína, 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, X-rodamina-5- (y 6)-isotiocianato (QFITC o XRITC), fluorescamina, ten-1-il]etenil]-1,1-dimetil-3-(3-sulfopropil)-, hidróxido, compuesto de sal interna con n,n-dietiletanamina(1:1) (IR144), perclorato de 5-cloro-2-[2-[3-[(5-cloro-3-etyl-2(3H)-benzotiazol-iliden)etyliden]-2-(difenilamino)-1-ciclopenten-1-il]etenil]-3-etyl benzotiazolio (IR140), isotiocianato de Verde Malaquita, 4-metilumbeliferona, orto cresolftaleína, nitrotirosina, pararosanilina, Rojo Fenol, B-ficoeritrina, o-ftaldialdehído, pireno, butirato de pireno, succinimidil 1-pireno, puntos cuánticos de butirato, Rojo Reactivo 4 (Cibacron™ Rojo Brillante 3B-A), rodamina y derivados, 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), lisamina rodamina B cloruro de sulfonilo rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, sulforodamina B, sulforodamina 101, derivado cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101 (Rojo Texas), N,N,N',N'tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) tetrametil rodamina, isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC), riboflavina, ácido rosólico, derivados de quelato de terbio, Cianina-3 (Cy3), Cianina-5 (Cy5), Cianina-5.5 (Cy5.5), Cianina-7 (Cy7), IRD 700, IRD 800, Alexa 647, La Jolta Blue, ftalo cianina, y naftalo cianina.
- 10 15 Cuando está implicada la imagenología óptica, el agente de diagnóstico puede ser agentes de contraste, por ejemplo, nanocristales semiconductores o puntos cuánticos. Para la imagenología por tomografía de coherencia óptica, el agente de diagnóstico puede ser un metal, tal como partículas nanojaula de oro o plata. El agente de diagnóstico puede ser nanopartículas de metal, tal como nanopartículas de oro o plata.
- 20 25 Un agente de diagnóstico puede incluir un agente de imagenología por resonancia magnética (MR). Los agentes de resonancia magnética ejemplares incluyen, pero no están limitados a, agentes paramagnéticos, agentes superparamagnéticos, y similares. Los agentes paramagnéticos ejemplares pueden incluir, pero no están limitados a, ácido gadopentético, gadolinio, gadoteridol, o ácido gadoxético. Los agentes superparamagnéticos pueden incluir, pero no están limitados a, óxido de hierro superparamagnético y ferristeno. Los agentes de diagnóstico pueden incluir un agente de contraste de rayos x. Los ejemplos de agentes de contraste de rayos x incluyen, sin limitación, iopamidol, iomeprol, iohexol, iopentol o metrizamida.
- 30 De manera similar a los agentes terapéuticos descritos anteriormente, los agentes de diagnóstico pueden estar asociados con el híbridsoma de una variedad de maneras, incluyendo, por ejemplo, estar incluidos en, encapsulados en, o unidos a, el híbridsoma. El agente de diagnóstico puede ser un complejo/conjugado de un ion metálico que puede estar unido covalentemente o no covalentemente a la superficie de una partícula. El agente de diagnóstico puede ser un radionucleótido que puede estar unido covalentemente o no covalentemente a la superficie de un híbridsoma. De forma similar, la carga de los agentes de diagnóstico puede llevarse a cabo a través de una variedad de maneras conocidas en la técnica. Un ejemplo de carga de agentes de diagnóstico en EDEM se encuentra en la Sección de Ejemplos.
- 35 40 Un híbridsoma puede comprender al menos un EDEM, que puede contener un agente activo, tal como un agente de diagnóstico y/o un agente terapéutico. El híbridsoma puede usarse como parte de una composición para tratar, monitorizar, prevenir, estadificar y/o diagnosticar una enfermedad o afección, incluyendo una enfermedad, tal como el cáncer. Esto puede conseguirse, por ejemplo, combinando un agente terapéutico y un agente de diagnóstico en el híbridsoma. Esto también puede conseguirse mediante la administración de un híbridsoma que incluye una primera subpoblación cargada con un agente terapéutico y una segunda subpoblación cargada con un agente de diagnóstico. Un método para diagnosticar una enfermedad o afección que se puede diagnosticar mediante la administración de un agente de diagnóstico, puede comprender administrar un híbridsoma de la invención a un sujeto que lo necesita.
- 45 Una composición farmacéutica que comprende el híbridsoma y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable puede usarse, por lo tanto, para aplicaciones de diagnóstico.
- 50 55 Una composición farmacéutica puede comprender un híbridsoma en donde los agentes activos incorporados en los BDM incitan una respuesta inmune frente a uno o más antígenos asociados con enfermedad tal como, por ejemplo, un antígeno tumoral. Una composición farmacéutica que comprende un híbridsoma capaz de incitar una respuesta inmune puede ser útil en el contexto de la inmunoterapia, por ejemplo, frente al cáncer o infecciones.
- Los BDM pueden comprender antígenos asociados con enfermedad generados *in vivo*, tales como uno o más antígenos asociados con tumor, uno o más antígenos asociados con patógenos o uno o más antígenos asociados con enfermedades degenerativas. El término "antígenos asociados con enfermedad" puede estar relacionado con proteínas producidas en las células asociadas a la enfermedad que tienen una estructura anormal y/o un patrón de expresión anormal en comparación con las células no asociadas a enfermedad. Las proteínas anormales también son producidas por células infectadas con oncovirus, p. ej., EBV y HPV. Por ejemplo, los BDM son muy adecuados para presentar antígenos que pueden estimular las respuestas inmunes deseables en sujetos. Esta ventaja puede surgir porque los BDM son producidos por células, en lugar de ser sintetizados artificialmente, y, por lo tanto, proporcionan antígenos que son "naturales". Esto es, los antígenos producidos por las células y encontrados en los BDM pueden ser péptidos de longitud completa que son

- procesados (p. ej., glicosilados, etc.) y plegados por la célula hasta un grado similar al que experimentan los antígenos por las células inmunes en un sujeto. Además de las proteínas, otras sustancias como glicolípidos y glicoproteínas de la superficie de la célula también pueden tener una estructura anormal en las células asociadas a enfermedad y podrían ser así dianas del sistema inmune. Como tales, los antígenos del BDM pueden utilizarse en vacunas o en tratamientos frente a, por ejemplo, cánceres. Por lo tanto, el uno o más antígenos puede comprender cada uno un antígeno de célula cancerosa. Como ejemplos no limitativos, el antígeno de célula cancerosa puede ser fosfatasa alcalina de tipo placentario, p53, p63, p73, mdm-2, procatepsina-D, B23, C23, PLAP, CA125, MUC-1, cerB/HER2, NY-ESO-1, SCP1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, HSP27, HSP60, HSP90, GRP78, TAG72, HoxA7, HoxB7, EpCAM, ras, mesotelina, survivina, EGFK, MUC-1, y c-myc.
- 5 Los BDM pueden derivar de células presentadoras de antígenos. Los BDM pueden derivar de células presentadoras de antígenos enfermas. Los BDM pueden comprender antígenos asociados con tumor de leucemia linfocítica crónica (CLL) y linfoma de las células del manto. Por ejemplo, los BDM derivan de células de linfoma de las células del manto que portan el receptor transmembrana con actividad proteína tirosina quinasa ROR1.
- 10 Una composición farmacéutica puede comprender un híbridsoma en donde los agentes activos incorporados en los BDM incitan capacidades de supresión inmune a la composición como, por ejemplo, se desea en el contexto de enfermedades autoinmunes, infecciones, alergias y trasplante para evitar la activación y/o sobrereacción perjudicial del sistema inmune de un sujeto. Este aspecto puede llevarse a cabo aislando BDM que presentan uno o más agentes inmunosupresores. Dichos BDM pueden inhibir la reacción inmune desarrollada como resultado del trasplante de células alogénicas/xenogénicas o terapia génica. Los BDM inmunosupresores aislados de trombocitos y neutrófilos polimorfonucleares activados se muestran en los ejemplos.
- 15 Una composición farmacéutica puede comprender un híbridsoma para la administración de agentes terapéuticos.
- 20 Tal y como se usa en la presente memoria, "composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende unidades físicamente discretas que se van a administrar en dosificaciones únicas o múltiples, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de al menos un ingrediente farmacéuticamente activo, y al menos otro ingrediente seleccionado de excipientes farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica puede comprender híbridsomas para la administración dirigida de uno o más agentes activos a un tejido o célula en un organismo vivo. Una composición farmacéutica puede comprender híbridsomas para la administración de uno o más agentes activos a un tejido o célula *in vitro*.
- 25 El híbridsoma puede usarse como sistemas para la administración de un agente activo, tal como un agente terapéutico y/o de diagnóstico, a una célula o tejido diana en un animal tal como un mamífero o en un ser humano. Un híbridsoma que comprende un agente terapéutico y/o de diagnóstico puede administrarse al paciente que lo necesita. La administración de un agente activo, tal como un agente terapéutico y/o de diagnóstico, puede constituir un medio de terapia.
- 30 El término "terapia" o "tratamiento" se refiere a un proceso que se pretende para producir un cambio beneficioso en la afección de un individuo como un mamífero, p. ej., un ser humano, referido frecuentemente como un paciente, o animal. Un cambio beneficioso puede incluir, por ejemplo, uno o más de: restauración de función, reducción de síntomas, limitación o retraso de la progresión de una enfermedad, trastorno o afección o prevención, limitación o retraso del deterioro de la afección, enfermedad o trastorno de un paciente. Dicha terapia engloba habitualmente la administración de un agente activo mediante un híbridsoma, entre otros.
- 35 El término "tratar" se reconoce en la técnica e incluye prevenir que ocurra una enfermedad, trastorno o afección en un organismo vivo, tal como un mamífero o en un ser humano, que puede estar predisposto a la enfermedad, trastorno y/o afección, pero que todavía no ha sido diagnosticado como que la tiene; inhibir la enfermedad, trastorno o afección, p. ej., impedir su progreso; y aliviar la enfermedad, trastorno, o afección, p. ej., causar la regresión de la enfermedad, trastorno y/o afección. Tratar la enfermedad o afección incluye mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o afección particular, incluso si no se ve afectada la patofisiología subyacente, tal como tratar el dolor de un sujeto por la administración de un agente analgésico, aunque dicho agente no trata la causa del dolor.
- 40 Como se ha mencionado anteriormente, el híbridsoma puede comprender agentes terapéuticos que pueden seleccionarse dependiendo del tipo de la enfermedad que se desea tratar. Por ejemplo, determinados tipos de cánceres o tumores, tales como leucemia, linfoma, mieloma, carcinoma y sarcoma, así como tumores sólidos y tumores mixtos, pueden implicar la administración de los mismos o posiblemente diferentes agentes terapéuticos.
- 45 Un experto en la técnica también reconocerá que el híbridsoma puede usarse para diversos propósitos. Los métodos para tratar a pacientes que usan agentes activos se han usado durante mucho tiempo. Sin embargo, en la mayor parte de los métodos de la técnica anterior, el agente activo se administró habitualmente al cuerpo humano o animal completo, sin estar dirigido a un sitio particular afectado por una enfermedad. Así, en los métodos de la técnica anterior, el agente activo

se distribuye uniformemente en el organismo completo. Un inconveniente de los métodos de la técnica anterior es que también pueden verse afectadas por el agente activo las regiones no afectadas del cuerpo humano o animal. Además, solo una pequeña parte del agente activo podría actuar en el sitio enfermo.

- 5 Un híbridsoma mejora la probabilidad de que cantidades apropiadas de los materiales encapsulados (p. ej., agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico) se administren a células o tejidos diana, minimizando posteriormente los efectos adversos sistémicos potenciales o toxicidad asociada con los módulos no unidos o sus contenidos encapsulados. Por ejemplo, cuando un EDEM (p. ej., una iLNP) comprende o está enriquecido de otra forma con uno o más de los lípidos ionizables, la transición de fase en la bicapa lipídica de una o más células diana puede facilitar la administración de los materiales encapsulados (p. ej., uno o más agentes activos encapsulados en una nanopartícula de lípido) en las células diana. De forma similar, los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse para preparar híbridsomas que se caracterizan por su toxicidad reducida *in vivo*. La toxicidad reducida puede ser una función de las altas eficiencias de transfección asociadas con las composiciones descritas en la presente memoria, de manera que una cantidad reducida de dicha composición puede administrarse al sujeto para conseguir una respuesta o resultado terapéutico deseado.
- 10 15 El híbridsoma puede diseñarse para facilitar la encapsulación y la liberación de los materiales encapsulados (p. ej., uno o más agentes activos) en una o más células y/o tejidos diana. Por ejemplo, cuando un híbridsoma comprende o está enriquecido de otra forma con uno o más de los lípidos fusogénicos, la transición de fase y la disrupción potencial en la bicapa lipídica de una o más células diana puede facilitar la administración de los materiales encapsulados (p. ej., uno o más encapsulados activos en un híbridsoma).
- 20 25 De forma similar, la incorporación de lípidos con grupos de cabeza hidrófilos ionizables en los EDEM puede servir para estimular la liberación endosómica o lisosomal de los contenidos que están encapsulados en el híbridsoma. Dicha liberación aumentada puede conseguirse por un mecanismo de disrupción mediado por esponja de protones, en el que la capacidad de un compuesto en el EDEM, puede tamponar la acidificación del endosoma, que, a su vez, estimula el hinchamiento osmótico y la disrupción de la membrana lipídica endosómica o lisosomal y facilita la liberación intracelular de la carga encapsulada en el mismo en la célula diana.
- 30 35 40 45 El híbridsoma también puede proporcionar al menos una de las siguientes ventajas adicionales para el tratamiento: (1) un tiempo de circulación incrementado del sistema de administración; (2) una captación mitigada de RES del híbridsoma usando los BDM derivados del paciente y opcionalmente añadiendo restos estabilizadores; (3) la prevención de la liberación prematura de la carga desde el interior del híbridsoma debido a una encapsulación estable; (4) una respuesta del sistema inmune reducida cuando se introduce en un cuerpo de un sujeto debido a la presencia de componentes endógenos del BDM; (5) una transcitosis incrementada del híbridsoma a través de las barreras bilógicas (p. ej., barrera endotelial, barrera hematoencefálica) en la vasculatura debido a los restos de direccionamiento endógenos en el BDM o restos de direccionamiento exógenos unidos al EDEM; (6) una acumulación incrementada del híbridsoma en un sitio enfermo, tal como un sitio tumoral; (7) una internalización incrementada en endosomas de la célula diana debido a que los restos de direccionamiento endógenos se originan a partir del BDM y liberación endosómica posterior debido a las propiedades fusogénicas suministradas por el EDEM. Como se ha discutido anteriormente, el híbridsoma permite la administración de un agente activo preferentemente a un sitio enfermo. Dicha administración dirigida también puede permitir que se eviten altas dosis de un agente activo. Dicha administración dirigida puede aumentar la eficacia del agente activo. Esto, a su vez, puede ayudar a prevenir efectos secundarios tóxicos que están asociados con la administración de altas dosis de diversos agentes activos o efectos asociados con el vehículo en sí mismo (p. ej., lípidos, restos de direccionamiento exógenos). Puede ser posible tratar o detectar enfermedades con bajas dosis de un agente activo de una manera dirigida sin afectar a las regiones no implicadas del cuerpo.
- 45 50 55 Un híbridsoma que comprende BDM con restos de direccionamiento disponibles endógenamente pueden facilitar la administración exitosa de agentes activos a tipos de células que se sabe en la técnica que son difíciles de transfectar *in vivo* e *in vitro* (p. ej., células madre y células inmunes). Por ejemplo, los híbridsomas que comprenden BDM derivados de leucocitos pueden mostrar una captación celular aumentada, mientras los EDEM solos muestran una captación celular reducida.
- El híbridsoma puede usarse para tratar, monitorizar, prevenir y/o diagnosticar varias enfermedades y afecciones (p. ej., inflamación, tal como inflamación asociada con cáncer). Esto puede implicar la administración del mismo o posiblemente diferentes agentes terapéuticos a un sitio afectado por una enfermedad o afección. Los sistemas de administración pueden ser particularmente útiles para aplicaciones oncológicas, tal como para el tratamiento, monitorización, prevención y/o diagnóstico de una afección cancerosa (p. ej., célula de tumor maligno). El híbridsoma puede usarse para administrar un agente activo (p. ej., un agente terapéutico y/o de diagnóstico) a un sitio afectado con cáncer (p. ej., un tumor). Los ejemplos no limitativos de afecciones cancerosas que pueden tratarse, monitorizarse, prevenirse y/o diagnosticarse incluyen, sin limitación, leucemia, linfoma, cánceres de la piel (incluyendo melanomas, carcinomas de células basales, y carcinomas de células escamosas), carcinomas epiteliales de la cabeza y el cuello, cánceres de pulmón (incluyendo carcinoma escamoso o epidermoide, carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma, y carcinoma de células grandes), cáncer de mama,

- cánceres del tracto gastrointestinal, tumores malignos del tiroides, sarcomas del hueso y tejido blando, cáncer de ovario, carcinoma del tipo de falopio, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, carcinoma prostático, cáncer testicular, cáncer de la vejiga, carcinoma de células renales, cáncer pancreático, y cáncer hepatocelular. Un cáncer puede caracterizarse por tumores sólidos. La enfermedad se selecciona del grupo que consiste en un cáncer y la enfermedad de Parkinson.
- 5 El hibridosoma puede usarse para administrar un agente activo a células infectadas con virus. El hibridosoma puede usarse para tratar, monitorizar, prevenir y/o diagnosticar infecciones virales.
- El hibridosoma puede usarse para tomar como diana un sitio inflamado en un sujeto. Por lo tanto, el hibridosoma puede usarse para tratar, prevenir, monitorizar y/o diagnosticar una afección o enfermedad asociada con una inflamación. Las afecciones representativas incluyen, sin limitación: alergias; asma; enfermedad de Alzheimer; diabetes; desequilibrios hormonales; enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoide y psoriasis; osteoartritis; osteoporosis; aterosclerosis, incluyendo enfermedad arterial coronaria; vasculitis; afecciones inflamatorias crónicas, tales como obesidad; úlceras, tales como úlcera de Marjolin; inflamaciones respiratorias causadas por asbestos o humo de cigarrillos; inflamaciones del prepucio; inflamaciones causadas por virus, tales como virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B o C o de Epstein-Barr; esquistosomiasis; enfermedad inflamatoria pélvica; inflamación del epitelio del ovario; metaplasia de Barrett; gastritis por H. pylori; pancreatitis crónica; infestación por trematodo hepático chino; colecistitis crónica y enfermedad inflamatoria del intestino; cánceres asociados con inflamación, tales como cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama; cánceres del tracto gastrointestinal, tales como cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer nasofaríngeo, cáncer esofágico, colangiocarcinoma, cáncer de la vesícula biliar y cáncer anogenital; cáncer intergumentario, tal como carcinoma de la piel; cánceres del tracto respiratorio, tales como cáncer bronquial y mesotelioma; cáncer del tracto genitourinario, tal como fimosis, carcinoma del pene y cáncer de vejiga; y cáncer del sistema reproductor, tal como cáncer de ovario. El hibridosoma puede usarse conjuntamente o concurrentemente con otros métodos conocidos de tratamiento de enfermedades, incluyendo, pero no limitado a, quimioterapia y radioterapia.
- 25 También es posible modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Esto comprende generalmente poner en contacto una célula con un hibridosoma que está asociado con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana.
- El tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, comprende proporcionar al sujeto el hibridosoma, en donde el agente terapéutico se selecciona de un ARNsi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNsi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNsi, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.
- 30 Estos métodos pueden llevarse a cabo mediante la puesta en contacto del hibridosoma con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que ocurra la administración intracelular (p. ej., en el interior del núcleo). Las aplicaciones típicas incluyen el uso de procedimientos muy conocidos para proporcionar la administración intracelular de ARNsi para inactivar o silenciar dianas celulares específicas. Alternativamente, las aplicaciones incluyen la administración de secuencias de ADN o ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. De esta manera, se proporciona terapia para enfermedades genéticas mediante el suministro de productos génicos deficientes o ausentes.
- 35 En la presente memoria también se contempla la coadministración de uno o más materiales encapsulados únicos a células diana por el hibridosoma. Por consiguiente, mediante la unión de dos EDEM únicos con agentes activos únicos en un único hibridosoma, es posible tratar un único trastorno o deficiencia, en donde cada uno de dichos agentes activos funciona por un mecanismo de acción diferente. Por ejemplo, el hibridosoma puede unirse tanto con un EDEM que comprende un polinucleótido encapsulado, que se pretende que desactive o "inactive" un polinucleótido endógeno que funciona mal y su producto proteico o enzimático, como un segundo EDEM que comprende una enzima encapsulada, que se pretende que proporcione un reemplazo enzimático. Un EDEM que contiene agentes de diagnóstico, tal como nanopartículas de oro, puede fusionarse con un BDM en un hibridosoma para tratar un trastorno y localizar células u órganos afectados a través de técnicas de visualización de diagnóstico. Es posible facilitar la coadministración, por ejemplo, de dos polinucleótidos (p. ej., miRNA) únicos producidos endógenamente, mediante la fusión de dos BDM únicos en el EDEM idéntico.
- 40 Los hibridosomas son adecuados para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la deficiencia de proteínas y/o enzimas en o secretadas por la célula diana. Por ejemplo, los síntomas de una enfermedad pueden mejorarse proporcionando las composiciones descritas en la presente memoria (p. ej., fibrosis quística). Los trastornos incluyen, pero no están limitados a, trastornos tales como la enfermedad de Pompe, enfermedad de Gaucher, beta-talasemia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, distrofias musculares (tales como, p. ej., de Duchenne y de Becker), enfermedades hemofílicas, atrofia muscular espinal relacionada con SMN1 (SMA), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), galactosemia, fibrosis quística (CF), deficiencias de galactocerebrósida, ataxia de Friedreich, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, y enfermedad de Niemann-Pick.
- 45
- 50
- 55

- Una nueva plataforma para el desarrollo de vacunas altamente inmunogénicas puede basarse en la coadministración de un BDM capaz de presentar un antígeno y EDM que contienen adyuvante. La administración combinada de adyuvantes con BDM presentadores de antígenos representa una estrategia prometedora para que las vacunas terapéuticas inciten una respuesta inmune innata explotando las propiedades principales de los dos componentes: (1) la capacidad adyuvante fuerte proporcionada por el EDEM; y (2) la respuesta inmune adaptativa específica frente al o a los antígenos presentados por el BDM y asociados con la enfermedad diana. Por ejemplo, el BDM puede presentar cualquier antígeno asociado con enfermedad, tal como uno o más antígenos asociados con tumor para la terapia del cáncer, uno o más antígenos patogénicos para el tratamiento de una infección, o cualquier otro antígeno o combinación de antígenos asociados con otras enfermedades, en particular, para afecciones inmunocomprometidas y/o donde es necesaria una potenciación fuerte de la inmunidad (p. ej., en los ancianos). Las composiciones de hibridosoma pueden inducir una respuesta inmune fuerte importante para las vacunas tales como aquellas frente al cáncer, hepatitis, gripe, malaria y VIH o para cualquier terapia donde puede ser beneficiosa la presentación de una combinación de antígenos al sistema inmune de un paciente.
- Una respuesta inmune puede incitarse mediante la administración de un hibridosoma que puede incluir un antígeno asociado con enfermedad. (Publicación de EE. UU. No. 20120189700). El EDEM puede formularse para uso en una vacuna tal como, pero no limitado a, frente a un patógeno o cáncer.
- El EDEM puede formularse para uso como una vacuna. El EDEM puede encapsular al menos a una molécula de ácido nucleico y/o ARNm que codifica al menos un antígeno. El EDEM puede incluir al menos un antígeno exógeno y un excipiente para una forma de dosificación de vacuna (véase la Pub Internacional No. WO2011150264 y la Pub de EE. UU. No. US20110293723). La forma de dosificación de vacuna puede seleccionarse por métodos descritos en la presente memoria, conocidos en la técnica y/o descritos en la Pub Internacional No. WO2011150258 y en la Pub de EE. UU. No. US20120027806.
- El EDEM puede comprender al menos un adyuvante. En otra realización, el EDEM puede comprender al menos un agente terapéutico y al menos un adyuvante. Como un ejemplo no limitante, el EDEM que comprende un adyuvante puede formularse por los métodos descritos en la Pub Internacional No. WO2011150240 y en la Pub de EE. UU. No. US20110293700.
- El EDEM puede encapsular al menos a un antígeno asociado con enfermedad exógeno que codifica un péptido, fragmento o región de un virus. Como un ejemplo no limitante, el EDEM puede incluir, pero no está limitado a, los antígenos descritos en la Pub Internacional No. WO2012024621, WO201202629, WO2012024632 y en la Pub de EE. UU. No. US20120064110, US20120058153 y US20120058154.
- El hibridosoma puede usarse para administrar un agente terapéutico a una célula o tejido, *in vitro* o *in vivo*. Los métodos formulaciones pueden adaptarse fácilmente para la administración de cualquier agente terapéutico adecuado para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que sería aceptable para dicho tratamiento. Estos métodos pueden llevarse a la práctica *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, el hibridosoma también puede usarse para la administración de ácidos nucleicos a células *in vivo*, usando métodos que son conocidos para los expertos en la técnica. Una composición farmacéutica puede comprender un hibridosoma y un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones para inyección intravenosa (p. ej., disolución salina o dextrosa). La composición también puede tomar la forma de una crema, pomada, gel, suspensión, o emulsión.
- Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas que comprenden el hibridosoma se administran preferiblemente parenteralmente (p. ej., intraarticularmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, o intramuscularmente). Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse intravenosamente o intraperitonealmente por una inyección en bolo. Otras rutas de administración incluyen tópica (piel, ojos, membranas mucosas), oral, pulmonar, intranasal, sublingual, rectal, y vaginal. Además, una composición farmacéutica puede prepararse, adecuada para la administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en la forma de gotas oculares incluyendo, por ejemplo, una disolución y/o suspensión al 0,1/1,0 % (p/p) del ingrediente activo en un excipiente líquido acuoso o aceitoso. Dichas gotas pueden comprender además agentes tamponadores, sales, y/o uno o más de otros de cualesquier ingredientes adicionales.
- En la presente memoria también se describe una composición farmacéutica según lo anterior para la administración de agentes de diagnóstico.
- Además de la administración de agentes activos para tratamiento, el hibridosoma puede proporcionar un medio para la detección de tejido y células afectados por una enfermedad o una afección, así como la detección de la progresión o recaída después de la terapia. La imagenología no invasiva actual se basa en el uso de agentes de contraste que aprovechan el metabolismo incrementado metabólico y de aminoácidos en los tumores, pero estos están limitados por el ruido de fondo y la captación no específica. La composición farmacéutica según lo anterior puede usarse para la

administración de agentes de diagnóstico directamente en el sitio diana, tal como un sitio tumoral y/o un sitio de inflamación, para permitir la imagenología de diagnóstico y la localización precisa de la misma.

Como se caracteriza con detalle en las reivindicaciones adjuntas, la invención proporciona un proceso para la fabricación de un vehículo biocompatible híbrido (hibridosoma) que comprende elementos estructurales y bioactivos que se originan de al menos un módulo de administración biocompatible (BDM) y al menos un módulo de encapsulación de fármacos preparado por ingeniería (EDEM) que comprende al menos un resto fusogénico ajustable, comprendiendo dicho proceso:

- (a) proporcionar al menos un EDEM que tiene al menos un resto fusogénico o una composición que comprende el mismo;
- (b) proporcionar al menos un BDM o una composición que comprende el mismo;
- (c) poner en contacto al menos un EDEM con dicho al menos un BDM a un pH por debajo de 7,4 y a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, uniendo de esta manera al menos un EDEM con dicho al menos un BDM y produciendo dicho hibridosoma; y opcionalmente
- (d) purificar dicho hibridosoma de los EDEM y/o los BDM no fusionados.

El proceso tiene varias características importantes que hacen que sea sustancialmente útil en la técnica. La presente invención proporciona un proceso para crear un hibridosoma mediante la unión de uno o más EDEM y uno o más BDM para preparar un componente híbrido que presenta las características de los componentes EDEM y BDM originales. Generalmente, la unión de EDEM con BDM implica al menos una especie fusogénica presente en cualquiera de los dos componentes cuya fusogenicidad es ajustable cambiando el entorno de la reacción. En determinadas realizaciones, los EDEM (p. ej., iLNP) presentan selectivamente una capacidad aumentada (p. ej., interacción electrostática) para unirse con los BDM. En determinadas realizaciones, los BDM (p. ej., exosomas) presentan selectivamente una capacidad aumentada (p. ej., mayor fluidez de membrana) para unirse con los BDM. Por consiguiente, en la presente memoria se describen procesos para generar hibridosomas definiendo los entornos de la reacción. Dichos procesos comprenden generalmente la etapa de poner en contacto los BDM con los EDEM usados en la presente memoria (p. ej., una iLNP) de manera que el contacto causa una agregación simple y/o disruptión de la membrana con mezclado de lípidos mediante hemifusión y/o fusión, dando lugar a la fusión de alguna porción de las poblaciones de EDEM y BDM en una subpoblación de hibridosomas. Por la presente, los procesos contemplados tienen ventajas sustanciales debido a los medios para inducir, controlar, restringir y/o terminar el mecanismo de unión respectivo. Además, el proceso permite que las entidades modulares sean reemplazadas o reorganizadas para preparar una arquitectura terapéuticamente relevante.

Por ejemplo, una mezcla acuosa de EDEM que comprende vesículas preformadas con una morfología y características físicas definidas, en donde uno o más lípidos tienen o asumen características fusogénicas, se añade a una única cámara por una entrada y se añade una mezcla acuosa de BDM recogidos en una segunda entrada. Los componentes se ponen entonces en contacto en una cámara común. En una realización, dicho contacto se potencia por el mezclado de las composiciones originales mediante difusión. Por ejemplo, el mezclado ocurre por medios mecánicos (p. ej., agitación). Alternativamente, la unión de los BDM y los EDEM puede facilitarse mediante dinámica de fluidos controlada tal como en un dispositivo de mezclado microfluídico. En este caso, los EDEM y los BDM se inyectan en entradas separadas de una cámara microfluídica y se produce el mezclado controlado mediante la geometría y el perfil de flujo de la cámara.

Generalmente, el proceso para producir hibridosoma proporciona el control sobre las propiedades fusogénicas de los EDEM y los BDM. Para la producción del hibridosoma, se prefiere la inclusión de un entorno de la reacción en el que los componentes de los EDEM y/o de los BDM asumen atributos fusogénicos incrementados. Por ejemplo, un entorno de reacción ácido incrementa la carga superficial catiónica neta de los EDEM y puede simultáneamente hacer que los BDM asuman una carga superficial aniónica neta. En una realización preferida, la unión tiene lugar en un tampón ácido con un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, en otra realización, la temperatura de la reacción puede modularse para causar una transición de fase de los lípidos en los EDEM de bicapa a fase hexagonal mientras se disminuye simultáneamente la rigidez de la membrana en los BDM. La temperatura de la reacción está limitada a aproximadamente 60 °C debido a la degradación potencial de los constituyentes de los BDM (p. ej., proteínas). En una realización preferida, una temperatura de la reacción se ajusta a 37 °C. En una realización, el entorno de la reacción presenta una fuerza iónica fisiológica. La presente invención contempla, pero no está limitada a, el uso de mezclas de NaCl o KCl. En una realización adicional, la disolución de la reacción puede tener presentes iones calcio.

La invención proporciona así un proceso para producir hibridosoma en donde la unión de los EDEM y el BDM se facilita por la coincubación en un entorno reactivo durante un periodo de tiempo, incluyendo, pero no limitado a 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas o more. En una realización preferida, la coincubación tiene lugar durante aproximadamente 1 hora.

- En variaciones particulares de este proceso, el entorno del mezclado se altera para limitar la unificación de los módulos. En general, la unificación de EDEM y BDM se controla por varios parámetros, que pueden incluir la concentración de la carga superficial neta de las partículas, densidad de carga, pH, fuerza iónica, concentraciones de aditivos y temperatura. Los métodos para alterar el entorno del mezclado son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, pero no limitado a, puede usarse la adición de disoluciones con mayores capacidades de tampón o la diálsis de las mezclas de módulos para alterar las propiedades de la disolución de la reacción. En una realización preferida, pueden emplearse columnas de desalado para cambiar las propiedades de los solutos.
- La invención se refiere además a un proceso para producir híbridosomas donde el proceso puede incluir opcionalmente la etapa de purificar estos híbridosomas de los módulos individuales en exceso. Para la producción de los híbridosomas, se prefiere la inclusión de la etapa de purificación. Cuando se desea la purificación de los híbridosomas, la purificación puede conseguirse por centrifugación a través de un gradiente de densidad de sacarosa u otro medio que sea adecuado para formar un gradiente de densidad. Sin embargo, se entiende que también pueden utilizarse otros métodos de purificación tales como cromatografía, filtración, partición de fases, precipitación o absorción. Los métodos de purificación incluyen, por ejemplo, purificación mediante centrifugación a través de un gradiente de densidad de sacarosa, o purificación a través de una columna de exclusión por tamaño. El gradiente de sacarosa puede variar de aproximadamente sacarosa al 0 % a aproximadamente sacarosa al 60 %, preferiblemente de aproximadamente sacarosa al 5 % a aproximadamente sacarosa al 30 %. El tampón en el que se prepara el gradiente de sacarosa puede ser cualquier tampón acuoso adecuado para el almacenamiento de la fracción que contiene los complejos y preferiblemente, un tampón adecuado para la administración de los híbridosomas a células y tejidos. Las técnicas de separación alternativas pueden incluir, pero no están limitadas a, enfoque isoeléctrico y/o cromatografía de inmunoafinidad. Por ejemplo, los EDEM que comprenden lípidos ionizables presentan una carga superficial catiónica neta y pueden separarse mediante electroforesis. La purificación de los híbridosomas también puede conseguirse por técnicas de purificación secuencial. Por ejemplo, una primera cromatografía de inmunoafinidad relacionada con la afinidad para moléculas de la superficie de los BDM seguida de una segunda cromatografía de inmunoafinidad relacionada con la afinidad de las moléculas de PEG pueden separar secuencialmente los híbridosomas de los BDM y EDEM en exceso. Una técnica de separación adicional podría englobar el fraccionamiento de flujo de campo asimétrico acoplado con dispersión de la luz con múltiples ángulos para fraccionar las vesículas de reactante y de producto.
- Los EDEM facilitan o aumentan la encapsulación y la liberación de los materiales encapsulados (p. ej., un agente activo) a uno o más BDM diana (p. ej., mediante permeación o fusión con las membranas de lípido de los BDM). Las características estructurales de los EDEM y los BDM descritos en la presente memoria pueden demostrar altas eficiencias de fusión. El término "eficiencia de fusión" se refiere a la cantidad relativa de híbridosomas generada a partir de los EDEM y los BDM que se someten a fusión. Las características estructurales de los EDEM y los BDM descritos en la presente memoria pueden demostrar altas eficiencias de fusión mejorando de esta manera la probabilidad de que se combinarán cantidades apropiadas de materiales encapsulados (p. ej., agente activo) y biomaterial endógeno en un híbridosoma y minimizando posteriormente los efectos adversos sistémicos potenciales o toxicidad asociados con el compuesto o sus contenidos encapsulados.
- Las formulaciones de EDEM pueden tener atributos ajustables para impartir la producción del híbridosoma del que dicho módulo es un componente (p. ej., compatibilidad de membrana). Por ejemplo, la incorporación de lípidos ionizables, lípidos auxiliares, lípidos modificados con PEG, polímeros que responden al pH y/o péptidos que penetran en las células activados por pH en el EDEM descrito en la presente memoria, puede controlar la fusogenicidad de dicho módulo (o del híbridosoma del que dicho módulo es un componente) con la membrana de lípido de uno o más BDM diana, aumentando de esta manera, por ejemplo, el control sobre la unificación EDEM-BDM. Sin pretender la vinculación a una teoría específica, la relación molar relativa de los lípidos de iLNP entre sí se basa en las características de los lípidos seleccionados, la naturaleza del BDM diana, las características de los materiales encapsulados y aquellas de la diana de administración pretendida (p. ej., célula, tejido u órgano). Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la toxicidad, tamaño, carga, pKa, fusogenicidad y la saturación de la cadena alquilo de los lípidos seleccionados.
- El contenido de lípido ionizable de las composiciones de EDEM usadas en la presente memoria puede caracterizarse como que tiene una o más propiedades que proporcionan a dichos módulos ventajas respecto a otras subunidades clasificadas. Por ejemplo, los EDEM usados en la presente memoria permiten el control y personalización de las propiedades de unión (p. ej., carga superficial). En particular, los compuestos descritos en la presente memoria pueden caracterizarse por una naturaleza catiónica definida y ajustable, así como por su capacidad de unirse con BDM potencialmente cargados opuestamente. Dichas capacidades pueden incluir, por ejemplo, la formación controlada de pares iónicos, capacidades de fusogenicidad y/o estímulo de la liberación de los materiales encapsulados (p. ej., agentes activos) en la composición generada.
- Las formulaciones de EDEM pueden tener atributos ajustables para impartir la compatibilidad de membrana entre los EDEM y los BDM. Por ejemplo, la incorporación personalizada de lípidos auxiliares en el EDEM descrito en la presente memoria, puede permitir una rigidez de la membrana compatible de dicho módulo para facilitar la unión con la membrana

de lípidos de uno o más BDM diana. Específicamente, la relación molar relativa de lípidos y esteroles, tales como colesterol, puede hacerse concordante para ser similar a las características del BDM diana. Las consideraciones adicionales incluyen, por ejemplo, la rigidez del hibridosoma resultante del que dicho módulo es un componente, para asegurar la interacción con la célula o tejido diana.

5 Los BDM pueden tener atributos ajustables para impartir la compatibilidad de membrana entre los EDEM y los BDM. Por ejemplo, un alto contenido de componentes de la membrana del BDM, tales como, pero no limitado a, esfingomielina, ácidos grasos saturados incorporados en fosfolípidos y colesterol pueden contribuir a una mayor rigidez que la célula donante de la que derivó. Simultáneamente, como los componentes de la membrana del BDM pueden ser diferentes de la membrana plasmática de las células de las que deriva un BDM, dando lugar a una mayor rigidez, los BDM pueden 10 mostrar una estabilidad aumentada durante el proceso de fabricación. Sin embargo, en un entorno con pH ácido (p. ej., aproximadamente pH 5), puede contemplarse que la membrana del BDM presenta una menor rigidez (y mayor fusogenicidad) y puede permitir la unión con la membrana del EDEM.

15 La incorporación de lípidos ionizables, por ejemplo, con uno o más grupos o restos alquil amino en los EDEM usados (p. ej., como un grupo de cabeza) puede promover además la disruptión de la membrana del BDM explotando su fusogenicidad. Esto puede estar basado no solo en el pKa optimizado y, por lo tanto, la naturaleza catiónica dependiente de pH del lípido, sino también en la temperatura de transición de fase optimizada, promoviendo una transición de una fase de bicapa a la fase H<sub>II</sub> hexagonal inversa altamente fusogénica (Semple et al., 2010). Se cree que el resultado promueve la formación de pares iónicos entre los lípidos ionizables en su estado catiónico y lípidos aniónicos, disrupriendo así la estructura de la membrana del BDM y transfiriendo los contenidos en el hibridosoma.

20 Los EDEM usados en la presente memoria pueden usarse para producir composiciones farmacéuticas que facilitan o aumentan la encapsulación y la liberación de los materiales encapsulados (p. ej., agentes activos) a uno o más BDM diana (p. ej., mediante permeación o fusión con las membranas de lípidos de los BDM). Por ejemplo, cuando una composición basada en lípidos (p. ej., una iLNP) comprende o está enriquecida de otra forma con uno o más de los lípidos ionizables, la transición de fase en la bicapa lipídica del uno o más BDM puede facilitar la administración de los materiales 25 encapsulados (p. ej., agentes activos encapsulados en una nanopartícula de lípidos) en uno o más hibridosomas.

30 El control sobre la cantidad total de lípidos ionizables en los EDEM puede servir para controlar las características estructurales de los hibridosomas descritos en la presente memoria. Por consiguiente, en determinadas realizaciones de la presente invención, las características físicas de los EDEM son proporcionales al contenido de lípidos ionizables. Por ejemplo, los EDEM con diámetro pequeño pueden tener un contenido global de lípidos ionizables menor en comparación con los EDEM con un diámetro mayor. Consecuentemente, uno o más de los EDEM descritos en la presente memoria 35 puede unirse con el BDM idéntico hasta que se consigue una carga superficial neta neutra y así una dimensión limitada.

35 Los EDEM pueden fabricarse para encapsular compuestos enzimáticos y catalíticos bioactivos que, después de la integración en el hibridosoma, son capaces de interaccionar con uno o más compuestos que se originan del BDM. Por ejemplo, los EDEM pueden fabricarse para contener ribonucleasas, capaces de degradar cualquier polinucleótido endógeno transferido en un hibridosoma por el BDM.

Los siguientes ejemplos, que describen adicionalmente la invención, se ofrecen como ilustración y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. Estos ejemplos, siempre que no se refieran al proceso reivindicado como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas, son solo para referencia.

#### Ejemplo de referencia 1

40 Producción de iLNP como módulos preparados por ingeniería y encapsulantes de fármacos

Materiales y métodos para los ejemplos 1-4

##### A) Productos químicos

45 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen-glicol)-2000] (amina-PEG-DSPE), [1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)] (NBD-PE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida (polietilen glicol)-2000] (mal-PEG-DSPE), diestearoil-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), N-palmitoil-esfingosina-1-succinil[metoxi(polietilen glicol)2000] (PEG-Cer) y colesterol se adquirieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Las síntesis de 1,2-dilinoleiloxy-3-dimetilaminopropano (DLinDMA) y PEG-lípidos se han descrito previamente (Heyes, Palmer, Bremner, y MacLachlan, 2005).

##### B) Formulación basada en extrusión de las iLNP

- Preparación de vesículas preformadas: Dependiendo de las propiedades deseadas de la vesícula, el lípido catiónico ionizable (DLinDMA o DODAP), DSPC, colesterol y PEG-lípido (PEG-s-DMG o PEG-Cer) se solubilizaron en etanol a una relación molar apropiada (p. ej., 40:17,5:40:2,5). Para formar las vesículas, la formulación de lípido se mezcló en un tampón acuoso de pH bajo (acetato 50 mM, pH 4) con agitación con vórtex hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 10 mM y una relación etanol a acuoso de 3:7. Las vesículas multilaminares generadas se extruyeron entonces a través de dos filtros Nuclepore™ de policarbonato apilados con un tamaño de poro de 80 nm o 100 nm (Whatman) usando un Mini Extrusor (Avanti,) a temperatura ambiente.
- Encapsulación de oligonucleótidos en las vesículas preformadas: La encapsulación de los oligonucleótidos se consiguió usando el método de vesículas preformadas descrito previamente (Maurer et al., 2001). En general, el oligonucleótido se solubilizó en una disolución acuosa concordante con la de las vesículas extruidas (acetato 50 mM, pH 4, etanol al 30 %) y adición posterior gota a gota a las vesículas unilamelares con mezclado con vórtex. La encapsulación del plásmido, ARNsi y ARNsh se realizó a una relación p/p de plásmido a lípido de 1:30 y una relación p/p de ARN a lípido de 1:16, respectivamente. La mezcla se incubó entonces a 37 °C durante 30 min seguido de la eliminación del etanol residual y el intercambio de tampón mediante diálsis exhaustiva frente a PBS (pH 7,4) a 4 °C. El ARNsh y plásmido no encapsulado se eliminaron mediante una columna de centrifugación de intercambio aniónico (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.), equilibrada con PBS (pH 7,4). La eficiencia de la encapsulación del oligonucleótido se determinó por absorción a 260 nm (Spectramax M5e, Molecular Devices) después de solubilizar las vesículas cargadas en una relación de volumen de 1:5 con isopropanol ácido (HCl al 10 %).
- iLNP encapsulantes de proteínas: En comparación con el protocolo anterior, las iLNP que encapsulan albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich) y hemoglobina humana (Sigma Aldrich) se prepararon disolviendo la proteína en el tampón acuoso (acetato de sodio 50 mM, pH 5,5) previamente para alcanzar una concentración final de 1,5 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, seguido de la adición gota a gota de la disolución etanólica (contenido de EtOH final del 20 %) de la mezcla de lípidos (relación molar de 40:17,5:40:2,5 de DlinDMA:DSPC:Col:PEG-Cer) con mezclado con vórtex. Esta disolución se incubó a 37 °C durante 1 h. Las vesículas de lípidos que encapsulaban BSA se extruyeron como se ha descrito anteriormente. La eliminación de la proteína libre, etanol residual e intercambio de tampón se consiguieron a través de diálsis exhaustiva (300 kDa MWCO, Spectrumlabs) frente a PBS (pH 7,4, 4 °C). La eficiencia de la encapsulación de proteínas se determinó mediante un kit de ensayo de proteínas BCA™ (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc..) después de solubilizar la iLNP con Triton X-100 al 10 % (Sigma Aldrich). La eliminación exhaustiva de la proteína libre se monitorizó por retención del detergente durante la cuantificación de la proteína.
- iLNP encapsulantes de moléculas pequeñas: De manera similar al protocolo anterior, las iLNP que encapsulan carboxifluoresceína se prepararon disolviendo la molécula pequeña en el tampón acuoso (acetato de sodio 25 mM, pH 5,5) previamente para alcanzar una concentración final de 1 mM, seguido de la adición gota a gota de la disolución etanólica (contenido de EtOH final del 20 %) de la mezcla de lípidos (relación molar de 40:17,5:40:2,5 de DODAP:DSPC:Col:PEG-Cer) con mezclado con vórtex. Esta disolución se incubó a 37 °C durante 1 h seguido de extrusión como se ha descrito anteriormente. La eliminación de moléculas pequeñas, etanol residual e intercambio de tampón se consiguieron a través de diálsis exhaustiva (300 kDa MWCO, Spectrumlabs) frente a PBS (pH 7,4, 4 °C).
- iLNP encapsulantes de nanopartículas de Au: Debido a la inestabilidad de las nanopartículas de Au en tampón iónico, la encapsulación de nanopartículas de Au de 20 nm (Nanocs Inc.) se consiguió manteniendo las nanopartículas de Au en disolución de agua desionizada a una relación en peso de oro a lípido de 1:20. Como se ha descrito anteriormente, se añadió la mezcla etanólica de lípidos, la disolución se extruyó y el tampón se intercambió a PBS mediante diálsis. En PBS, las nanopartículas de Au libres se agregan y sedimentan. La presencia de nanopartículas de oro encapsuladas se monitorizó por absorbancia a UV-Vis de las Au-iLNP alrededor de la longitud de onda de resonancia de plasmón de 525 nm, así como microscopía electrónica de transmisión (TEM). El incremento en la absorción UV-Vis a 450 nm en comparación con las vesículas vacías se usó para determinar las concentraciones de oro como se ha descrito previamente (Hails, Thanh, Aveyard, y Fernig, 2007). Como se muestra en la FIG. 1, los espectros de absorción de UV-Vis tanto de nanopartículas de oro de stock como de Au-iLNP muestran el pico característico de resonancia de plasmón superficial a aprox. 550 nm. Con detalle, se determinó una eficiencia de encapsulación del 30 % para las Au-iLNP y del 26 % para Au-ADN-iLNP a partir del incremento relativo en la lectura de absorción a 450 nm en comparación con las iLNP vacías y las ADN-iLNP. Las microfotografías electrónicas mostradas en la FIG. 2 apoyaron la presencia de nanopartículas de oro encapsuladas.
- C) Formulación de iLNP basada en microfluidos
- Preparación de nanopartículas de lípidos cargadas con ARNsi empleando un sistema microfluídico de mezclado rápido: Las nanopartículas de lípidos se prepararon en un sistema microfluídico Nanoassemblr™ (Precision NanoSistemas) según las instrucciones del fabricante. Dependiendo de la formulación deseada, se preparó una disolución de etanol similar a la de la estrategia de las vesículas preformadas, que consistió en DLinDMA, colesterol, DSPC y PEG-lípido a la relación molar apropiada (p. ej., 40:40:18:2), a concentraciones de lípido total de 10 mM. Además, se preparó una disolución acuosa

de ARNsi con una relación p/p de 1:16 de ARNsi a lípido en tampón acetato 25 mM a pH 4,0. Dependiendo del volumen total de producción, se usaron jeringas de 1 y 3 ml para crear la corriente de entrada con una velocidad de flujo total de 12 ml/min. Para cada formulación, la disolución acuosa de ARNsi se mezcló con la disolución de etanol-lípido con una relación de velocidad de flujo de 3:1 (Ac:Et) a temperatura ambiente. El producto se dializó entonces frente a PBS para eliminar el etanol residual, así como para elevar el pH a 7,4 y el ARNsi libre se eliminó como se ha descrito en el método de vesículas preformadas anterior.

#### 5 Ejemplo de referencia 2

##### Aislamiento de vesículas extracelulares (EV) como módulos de administración biocompatibles

Exosomas: Los exosomas se aislaron del sobrenadante de líneas celulares de linfoma de células del manto (MCL-exo) y glioblastoma (GBM-exo) por centrifugaciones diferenciales como se ha descrito previamente por Thery et al. (Théry, Amigorena, Raposo, y Clayton, 2006). Los exosomas se midieron entonces para determinar su contenido de proteínas usando un kit de ensayo de proteínas BCA™ (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.) y las partes alícuotas de exosomas se almacenaron a -80 °C. Para la purificación adicional, el sedimento de los exosomas se disolvió en PBS, se puso en capas en la parte superior de un colchón de sacarosa usando protocolos estándar.

Microvesículas: Las muestras de microvesículas derivadas de plaquetas y de neutrófilos polimorfonucleares activados humanos (PLT-MV y PMN-MV) se aislaron de especímenes humanos. Brevemente, las PLT-MV se aislaron por centrifugación diferencial de concentrados de plaquetas derivados de transfusiones de sangre de donantes sanos como se ha descrito anteriormente (Sadallah, Eken, Martin, y Schifferli, 2011). Las PMN-MV se purificaron como se ha publicado recientemente (Eken, Sadallah, Martin, Treves, y Schifferli, 2013); los PMN se aislaron de una capa leucoplaquetaria fresca de un donante sano. Se activaron con formil-metionil-leucil-fenilalanina y se aislaron microvesículas liberadas mediante centrifugación diferencial.

#### 20 Ejemplo de referencia 3

##### Modificación en superficie de iLNP por acoplamiento de lípidos pegilados con fragmentos Fab', fragmentos de anticuerpo, péptidos y glicosaminoglicanos

La compatibilidad de ingeniería de las iLNP se demostró por conjugación de un anticuerpo reducido, fragmento Fab', péptido de fusión y glicosaminoglicano a un lípido pegilado anclado en la membrana de las iLNP. En comparación con la formulación del ejemplo 1, se sustituyó 0,5 % en moles del lípido pegilado por lípidos modificados con PEG con un grupo maleimida o un grupo amina en el extremo distal del PEG. La conjugación se realizó según protocolos estándar basados en reacciones entre; (1) grupos maleimida en el extremo distal del PEG y grupos tiol libres del anticuerpo reducido, fragmento Fab' o péptidos tiolados en extremos. (2) grupos amina en el extremo distal del PEG y los grupos carboxilo activados de la cadena de glicosaminoglicano del glicosaminoglicano (GAG).

#### 30 Métodos:

Fragmento Fab': En primer lugar, se redujeron los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> anti-CD38 con 2-mercaptopropionilamina (MEA) (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.) usando un quinto de la concentración final mencionada por las instrucciones del proveedor.

35 Se incubaron 60 µg de F(ab)<sub>2</sub> con MEA 10 mM en tampón de reacción (EDTA 1 mM, PBS) durante 90 min a 37 °C. Se eliminó el MEA por intercambio de tampón a tampón de reacción con una columna de centrifugación de desalado Zeba™ (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.). Las iLNP cargadas con ARNsi se añadieron inmediatamente (relación de 2:1 mal:Fab') y se incubaron en una placa agitadora a 4 °C toda la noche. Los anticuerpos/fragmentos no unidos se separaron en una columna de Sefarosa CL-4B equilibrada con PBS (pH 7,4). Las fracciones que contenían fragmentos Fab' se determinaron a partir de la lectura de absorbancia a 280 nm, se combinaron entre sí y se concentraron en un filtro de centrifuga de 10 kDa (Amicon® Ultra-0,5, Merck Millipore). Se llevó a cabo una electroforesis en gel (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras, usando acrilamida al 10 %, para verificar la integridad de los fragmentos Fab' después del proceso de reducción de F(ab)<sub>2</sub> a Fab'.

40 Anticuerpo IgG: Los anticuerpos IgG se redujeron con ditiotreitol (DTT) (Sigma). Antes de la reacción de acoplamiento, el anticuerpo se redujo con DTT 25 mM durante 1 h a 4 °C en PBS. El Ab reducido se separó del DTT en exceso por el uso de una columna de centrifugación de desalado de 40 kDa Zeba™ (Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.) equilibrada con PBS (pH 7,4). La conjugación (relación de 1:4 mal:anticuerpo) se realizó en PBS (pH 7,4) toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos no unidos se eliminaron en una columna de Sefarosa CL-2. La conjugación del anticuerpo se determinó a partir de la lectura de absorbancia a 280 nm, como se ha descrito para los fragmentos Fab'.

45 Péptido: Un péptido análogo a la melitina de 26 aminoácidos con una cisteína N-terminal se conjuguó con pdNA-iLNP mezclando con el péptido tiolado a una relación molar de 1:1 péptido a maleimida y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Glicosaminoglicanos: Los glicosaminoglicanos (5 k PM) se conjugaron con el grupo amina del extremo distal del PEG a través de una reacción de acoplamiento EDC-Sulfo NHS convencional. En primer lugar, los glicosaminoglicanos se activaron con EDC/NHS (relación de 1:1 de EDC:COOH, relación de 1:1 de EDC/NHS) en DIW durante 1 h seguido de la adición de las iLNP (relación de 5:1 de glicosaminoglicano:amina) en PBS (pH 8,2). La reacción se continuó durante 2 h y se siguió de diálsis frente a PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente con un punto de corte de 10 kDa para eliminar los glicosaminoglicanos no unidos.

La conjugación exitosa se determinó además por medición de DLS del diámetro hidrodinámico. Como se puede observar en la Tabla 1, la comparación del diámetro hidrodinámico (Dh) por DLS, el diámetro medio de las iLNP se incrementó después del acoplamiento de las IgG, péptidos de fusión, fragmentos Fab' y glicosaminoglicanos.

10 Ejemplo de referencia 4

Caracterización de las iLNP y las EV secretadas *in vivo*

Después de fabricar las iLNP y de aislar las EV como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3, se registraron las distribuciones de tamaño de las iLNP y de las EV usando DLS (Zetasizer NS, Malvern) y NTA (LM20, Nanosight) usando protocolos estándar. Como se muestra en la Tabla 1, los tamaños promedio se incrementaron con la encapsulación de carga o modificación en superficie de las iLNP. Debido a las condiciones controladas de la síntesis, las iLNP pueden crearse con un índice de polidispersidad (PDI) pequeño, lo que también se refleja en la distribución de tamaño NTA monomodal aguda. Como vesículas secretadas, los exosomas tienen una polidispersidad heredada. Como se muestra en la FIG. 3, la estrategia de partícula única del análisis NTA revela una distribución de tamaño monomodal para las iLNP vacías y subpopulaciones con tamaños diferentes de GBM-exo.

Muestras	DLS <sup>a</sup> D <sub>h</sub> (nm)	PDI	NTA <sup>b</sup> D (nm)	Error Estándar	Encapsulación de Carga
<i>iLNPs vacías</i>					
PEG al 2,5 %	66,8	0,167	84,4 ± 1,6	-	-
PEG al 10 %	70,4	0,058	-	-	-
Lipido ionizable DODAP	121,2	0,098	-	-	-
<i>iLNPs con oligonucleótido</i>					
GFP oDNA					
ARNsh	89,3	0,210	99,0 ± 4,1	85,0 ± 4,9	60,4 % <sup>c</sup>
ARNsi	71,6	0,074	80,2 ± 0,8	30,0 ± 2,0	86,9 % <sup>c</sup>
ARNsi (dispositivo microfluidico)	128,0	0,056	-	-	66,3 % <sup>c</sup>
<i>iLNPs Modificadas en Superficie</i>					
PEG al 0,5 %-Mal (Vacía)	83,0	0,270	-	-	93,0 % <sup>c</sup>
PEG al 0,5 %-Mal (pDNA)	81,2	0,213	-	-	-
PEG al 0,5 %-Mal (ARNsi)	108,4	0,194	-	-	63,8 % <sup>c</sup>
PEG al 0,5 %-NH <sub>3</sub> (ARNsi)	111,0	0,049	-	-	83,43 % <sup>c</sup>
IgG-Mal Conj. (Vacía)	129,1	0,088	-	-	77,8 % <sup>c</sup>
Pep.-Mal Conj. (pDNA)	108,2	0,281	-	-	-
Fab-Mal Conj. (ARNsi)	116,6	0,345	-	-	-
GAG-NH <sub>3</sub> Conj. (ARNsi)	126,4	0,052	-	-	-
<i>iLNPs con Proteína</i>					
Albumina de Suero Bovino	189,3	0,248	-	-	-
Hemoglobina	155,9	0,210	-	-	0,599 mg/ml <sup>e</sup>
<i>iLNPs con Nanopartículas</i>					0,080 mg/ml <sup>e</sup>
NP con Oro 20 nm	202,5	0,274	-	-	-
NP con Oro 20 nm + pDNA	96,1	0,083	-	-	6,98x10 <sup>11</sup> N/ml <sup>f</sup>
Moléculas Pequeñas	104,2	0,155	-	-	6,06x10 <sup>11</sup> N/ml <sup>f</sup>
Carboxifluoresceína	96,1	-	-	-	-
Exosomas	83,6	0,106	-	-	-
Exosomas de GBM	127,7	0,250	128,3 ± 4,7	59,6 ± 4,8	-
Exosomas de Células B	126,0	0,100	186 <sup>g</sup>	69 <sup>g</sup>	-

<sup>a</sup> Los resultados representan la media de 3 experimentos  
<sup>b</sup> Los resultados representan la media ± SE de tres 1.800 marcos

<sup>c</sup> A260 UV-Vis (después de la disruptión con HCl-iPrOH)  
<sup>d</sup> A280 UV-Vis derivada de fracciones no conjugadas  
<sup>e</sup> Ensayo de Proteínas BCA (después de la disruptión con detergente)

<sup>f</sup> A450 UV-Vis (oro solo)

<sup>g</sup> Los resultados representan 900 marcos

Tabla 1 : Determinación del tamaño de las iLNPs y exosomas, así como de la eficiencia de encapsulación de carga

## Ejemplo 5

## Iniciación controlada de la interacción de los BDM y de los EDEM

Se investigó si la interacción entre las iLNP y los exosomas puede inducirse cambiando el pH del entorno. Como se muestra en la FIG. 4, el diámetro medio de una disolución de iLNP/exosoma se incrementa en el tampón de fusión (MES 10 mM, pH 5,5, NaCl 145 mM, KCl 5 mM) mientras no es evidente ningún cambio significativo en un pH 7,4. Como la naturaleza agrupada de las mediciones de DLS hace difícil deducir positivamente la presencia de interacciones entre las dos subunidades, a continuación el foco se centró en la interacción entre las membranas de lípidos tanto de los exosomas como de las iLNP.

A parte de los cambios de tamaño, el mezclado de lípidos entre dos membranas presenta un método adicional para determinar un evento de fusión. Durante un proceso de fusión, los lípidos de dos membranas se dispersan en la membrana recién formada. El mezclado de lípidos se monitorizó por el incremento en la fluorescencia que se produce por la dilución del tinte de rodamina lipófilo auto-apantallador (R18). Los exosomas (20 µg de proteína) se marcaron con 1 µl de una disolución etanólica de cloruro de octadecil rodamina B (R18) (Biotium) (1 mM) en tampón MES (MES 10 mM, pH 5,5, NaCl 145 mM, KCl 5 mM). Esta disolución se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. El R18 no incorporado se eliminó usando una columna desaladora Zebaspin® (punto de corte de 40 kDa), equilibrada con un tampón de fusión MES (MES 10 mM, pH 5,5, NaCl 145 mM, KCl 5 mM). Los exosomas marcados con R18 (5 µg de proteína total) se suspendieron en el tampón apropiado en una cubeta de cuarzo agitada y la fluorescencia de la muestra se midió mediante un espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer) a longitudes de onda de 560 nm de excitación y 590 nm de emisión. Después de un tiempo de equilibrado de 3 min, las iLNP no marcadas (30 µg de lípido total) se añadieron a los exosomas, y se monitorizó la fluorescencia durante 30 min más. La dilución máxima de R18 se obtuvo añadiendo Triton X-100 para disruptir las membranas. El grado del mezclado de lípidos se midió como la diferencia de la fluorescencia equilibrada de los exosomas solos y se expresó como el % de desapantallamiento máximo de fluorescencia después de la disruptión con detergente. De forma análoga a los exosomas, las muestras de microvesículas (proteína total de 0,25 µg de PLT-MV y 1,2 µg de PMN-MV) se marcaron con disolución etanólica de R18, seguido de la eliminación del tinte libre y la monitorización del incremento de la fluorescencia como se ha mencionado anteriormente.

Después de la fusión entre las iLNP no marcadas y los exosomas marcados con R18, la rodamina incorporada en la membrana del exosoma se dispersa en las porciones de membrana liposomal no marcadas, dando lugar a autoapantallamiento en espacios cercanos reducido y posteriormente la fluorescencia se incrementa proporcionalmente al grado de fusión de las membranas. Como se muestra en la FIG. 5, el incremento rápido de la fluorescencia ocurrió a un pH de 5,5, un incremento menor y continuo en la fluorescencia a un pH de 6,6, mientras el mezclado de lípidos se obstaculizó a un pH de 7,6. Para verificar que la naturaleza catiónica de las iLNP era la fuerza directora detrás del mezclado de lípidos y no un cambio de pH, la FIG. 6 muestra que la adición de liposomas de DLinDMA al 0 % (DSPC/Chol/PEG) no dio lugar a desapantallamiento. Con el fin de descartar que una propiedad fusogénica específica del lípido ionizable DLinDMA fuera potencialmente la fuerza directora detrás del mezclado de lípidos, se fabricaron iLNP en las que el DLinDMA se sustituyó por el lípido ionizable DODAP. Se observó el mezclado de lípidos después de añadir estas DODAP-iLNP a exosomas marcados con R18 (FIG. 7). Adicionalmente, se llevaron a cabo experimentos similares incrementando el contenido de PEG-lípido de las iLNP del 2,5 % en moles al 10 % en moles (FIG. 8) y variando la temperatura (FIG. 9).

## Ejemplo 6

## Interacción de BMD y EDEM ensayada en partículas únicas

A continuación, la investigación se centró en la interacción entre los exosomas y las iLNP al nivel de partículas únicas. El surgimiento temporal de partículas que comprendían una mezcla de proteína exosómica y membranas liposomales se cuantificó en un ajuste de espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS). En la preparación para las mediciones de FCCS, las membranas de las iLNP se marcaron con Bodipy™ lipófilo (630/650) mientras las proteínas de la superficie exosómica se marcaron por conjugación con Bodipy™ Éster de NHS (493/502). Tanto los exosomas como las iLNP se mezclaron entonces en tampón de fusión a números comparables de partículas y se registró el surgimiento de fluctuaciones de intensidad correlacionadas en ambos canales. Las señales sincronizadas en ambos detectores representan exosomas y iLNP bien agregados o fusionados, mientras las partículas individuales generan señales temporalmente independientes. En la FIG. 10, se muestra con el tiempo el incremento en el grado de correlación cruzada ( $\Theta$ ) cuando los exosomas-Bodipy™ (493) e iLNP-Bodipy™ (630) se mezclaron. No se observó ninguna correlación entre el canal verde y rojo justo después del mezclado de las dos partículas. Durante el curso de tiempo de 8 min, el grado de correlación cruzada de las partículas individuales se incrementó del 0 % a aproximadamente el 70 %, lo que implica que casi el 70 % de los estallidos fluorescentes totales de las partículas ensayadas presentaron proteínas de superficie exosómicas y membrana liposomal.

El grado de detección mínimo de la correlación cruzada se determinó usando una mezcla control de dos tintes hidrófilos (488 y 633). Como controles positivos, se usaron estándares IBA (IBA GmbH) de cadenas de ADN complementarias marcadas doblemente (488/633), para obtener el grado máximo que se puede conseguir de correlación cruzada.

#### Ejemplo 7

##### 5 Los EDEM y BDM fusogénicos se fusionan para formar híbridosomas

Con el fin de descartar la posibilidad de una simple agregación, ruptura estructural o ensayos de fusión falsos positivos debido a intercambio de lípidos, se registró el tamaño medio y la distribución de tamaños de una mezcla de iLNP/exosoma sin carga en un tampón de pH 5,5 a diferentes puntos de tiempo mediante DLS y NTA. Se usaron las mismas condiciones experimentales para monitorizar el tamaño medio promedio z durante un periodo de 10 h. Como se muestra en la FIG. 11, en la primera hora de mezclado, el tamaño medio de las partículas se incrementa rápidamente y permanece virtualmente inalterado durante las siguientes nueve horas. En el caso de la agregación, las vesículas cargadas opuestamente tienen la capacidad de agregarse continuamente en formaciones estructuradas electrostáticamente, aunque este no es el caso. Un indicador adicional que descarta la agregación es el grado de incremento del diámetro. El volumen de dos esferas fusionadas aumenta con el radio de una manera  $V \propto r^3$ , donde la fusión de una esfera de 85 nm y una de 130 nm daría lugar a una partícula de 141 nm. En la agregación, por otra parte, el radio aumenta linealmente con cada esfera adicional que se une a un agregado. Esto sería evidente por un incremento grande del diámetro en el rango de múltiplos del diámetro de la subunidad. Esto se apoya además como se muestra en la FIG. 12, una mezcla de ARNs-iLNP y MCL-exos en tampón de fusión (almacenado a temperatura ambiente) no mostró un incremento significativo en el diámetro medio durante un periodo de 9 días.

20 Para descartar que el cambio en el tamaño medio o distribución de tamaño gaussiana revelado por DLS no es un artefacto de subpoblaciones promedio, se evaluaron la distribución de tamaño de los exosomas, iLNP y productos de fusión basado en mediciones NTA de partículas individuales. Antes del análisis, las iLNP y los exosomas se diluyeron en tampón de fusión (20.000 veces para las iLNP y 0,01 mg de proteína exosómica por ml). Para la reacción de fusión, los exosomas y las iLNP se incubaron a una relación de 1:1 y una muestra tomada de la mezcla de reacción se registró cada 2 min. Se registró una película de 1.800 marcos por medición. Los datos se analizaron usando el paquete de software analítico NTA versión 3.0 con auto ajuste de desenfoque, longitud de rastreo mínima y tamaño de partícula esperado mínimo.

30 La monitorización de la distribución de tamaño en las reacciones de fusión durante el tiempo (FIG. 13) mostró que, después de 3 min de mezclado, una población de 50-90 nm de iLNP disminuyó en gran medida y una subpoblación a 90-125 nm se incrementa. Durante el curso de tiempo de 18 min, la distribución de tamaño muestra un pico de partículas de 144,2 nm y puede deducirse que el incremento de la fusogenicidad de los EDEM en la presencia de BMD da lugar a partículas que presentan una distribución de tamaño distinta. Estos perfiles de tamaño únicos de los exosomas, iLNP y partículas recién formadas se representan en la FIG. 14. La población de vesículas recién formadas se apoda "híbridosomas".

35 Las distribuciones de tamaño bien definidas en la FIG. 14 o la estabilidad prolongada del diámetro de las vesículas generadas que aparecen en la FIG. 11 y FIG. 12 son indicadores de una carga superficial neta amortiguada después de la fusión. Como consecuencia, las fusiones consecutivas están obstaculizadas y el sistema presenta un bucle de retroalimentación espontáneo.

#### Ejemplo 8

##### La transferencia génica mediada por híbridosomas da lugar a la expresión de GFP

40 Para demostrar la funcionalidad de la administración mediada por híbridosomas de carga genética, se fabricaron híbridosomas a partir de exosomas y iLNP de la línea celular GBM encapsulando un plásmido GFP. La expresión del GFP informador en las células GBM transfectadas con formulaciones de ensayo se analizó por citometría de flujo y microscopía confocal. Las células (50.000 células sembradas el día anterior) se transfecaron con iLNP (500 ng de GFP-pDNA por pocillo) e híbridosomas cargados (5 µg de proteína total/500 ng de GFP-pDNA por pocillo). Los híbridosomas se fabricaron antes de la transfección mezclando exosomas con pDNA-iLNP en tampón de fusión durante 30 min. Con el fin de descartar que la transfección es un resultado de la internalización fortuita de las iLNP debido a endocitosis inducida por los exosomas, las células también se cotransfектaron con iLNP no fusionadas (500 ng de GFP-pDNA por pocillo) y exosomas (5 µg de proteína total por pocillo). Después de tiempos de transfección de 0,5 h, 1 h, 2 h o 24 h, las células se lavaron dos veces con PBS, se añadió medio fresco y las células se cultivaron durante 72 h. La cantidad de células que expresaban GFP se analizó por citometría de flujo (véase la FIG. 15). Los híbridosomas muestran tasas de transfección mayores en comparación con las pDNA-iLNP o pDNA-iLNP no fusionadas que se cotransfектaron con el exosoma.

## Ejemplo de referencia 9

## Purificación de Hibridosomas

Para excluir la interferencia de las iLNP no fusionadas en los experimentos de transfección, se separaron de los hibridosomas por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa continuos. Para determinar la densidad de las pDNA-iLNP, se centrifugaron en gradientes de sacarosa al 0-55 % (p/vol) continuos (190.000 g, 14 h) y la columna se fraccionó. La densidad de las fracciones de sacarosa se determinó por un refractómetro y la presencia de partículas se analizó por recuento de fotones en DLS. Los datos revelan una densidad máxima de 1,05 g/ml de las pDNA-iLNP (véase la FIG. 16).

La centrifugación de mezclas de fusión pDNA-iLNP/exosoma (relación de proteína a plásmido de 1:0,1, p:p) en un gradiente de sacarosa correspondiente rindió una banda con opalescencia distinta que contenía las iLNP no fusionadas en la parte superior del gradiente. Las fracciones de sacarosa que correspondían a partículas con densidades de 1,06-1,08, 1,09-1,18, y 1,19-1,25 g/ml se combinaron y la sacarosa se eliminó por diálisis frente a PBS.

La capacidad de estas fracciones de transfectar GFP se monitorizó incubando con células (72 h, 50.000 células/pocillo) y analizando el número de células que expresaban GFP por citometría de flujo. Como se muestra en la FIG. 17 FIG. 16, todas las fracciones dieron lugar a la expresión de GFP. Los pDNA-hibridosomas (partículas por debajo de 1,05 g/ml) se combinaron, la sacarosa se eliminó por diálisis y se volvieron a ensayar en estudios de transfección independientes. Las células (50.000 células) se transfectaron con pDNA-hibridosomas (2,5 µg de proteína/pocillo sobre la base del ensayo BCA de la fracción combinada) durante 0,5 h, 1 h, 2 h o 24 h. Después de los tiempos de transfección indicados, las células se lavaron dos veces con PBS y se añadió medio de cultivo fresco. La cantidad de células que expresaban GFP después de un cultivo de 72 h se analizó por citometría de flujo (véase la FIG. 18).

## Ejemplo 10

## Restos de direccionamiento exógenos en hibridosomas

Las iLNP modificadas en superficie con IgG mostradas anteriormente se usaron para preparar hibridosomas con fragmentos de IgG en la superficie. De forma análoga al enriquecimiento de hibridosomas cargados con plásmido en el Ejemplo 9, las iLNP unidas con IgG se mezclaron con exosomas derivados de GBM en tampón de fusión durante 30 minutos (relación en peso de 6:1 de lípido a proteína exosómica) y las iLNP no fusionadas se separaron en un gradiente de sacarosa. Fue visible una capa de particulado a una densidad de 1,12-1,14 g/ml ( $R_f=0,62$  en comparación con  $R_f=0,36$  para los hibridosomas cargados con plásmido). Las fracciones por debajo de 1,08 g/ml se combinaron y se eliminó la sacarosa residual mediante diálisis frente a PBS. Se realizó electroforesis en gel (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras usando acrilamida al 10 % para verificar la presencia tanto de IgG como de proteína exosómica.

La línea celular GBM (50.000 células por pocillo sembradas el día anterior) se transfectó con IgG-hibridosomas purificados con gradiente de sacarosa (1,4 µg de contenido de proteína por pocillo como se determina por el ensayo BCA). Después de 24 h de incubación, las células se lavaron y, como se muestra en la FIG. 19, la citometría de flujo determinó que aproximadamente un 80 % de las células fueron positivas para el anticuerpo secundario anti-IgG marcado.

## Ejemplo 11

## Diversos EDEM para hibridosomas versátiles

La capacidad de producir distintos hibridosomas mediante la variación de la carga de EDEM o la modificación en superficie se determinó por dos tipos de ensayos de fusión.

Se realizó un ensayo con R18 como se muestra en el ejemplo 5. Brevemente, la fusión se determinó mezclando diferentes especies de iLNP mostradas en el Ejemplo 1 con exosomas derivados de la línea celular GBM, marcados con R18, en tampón de fusión. La fusión con las iLNP encapsulantes de oligonucleótidos, proteína y nanopartículas de oro (nanopartículas de oro solas o coencapsuladas con pDNA) se muestra en la FIG. 20 a la FIG. 22. La fusión entre los exosomas y las iLNP con péptido y modificación en superficie con IgG se muestra en la FIG. 23. Se empleó un ensayo de pireno para determinar la fusión de MCL-exosomas con iLNP cargadas con ARNsi. Estas ARNsi-iLNP se fabricaron por extrusión o por un chip microfluídico de mezclado rápido (como se muestra en el Ejemplo 1).

Este ensayo se basa en el incremento de la fluorescencia del monómero (aprox. 400 nm) debido a la dilución de los excímeros de pireno después de la fusión de membranas marcadas con membranas no marcadas. Los exosomas (35 µg de proteína total) en 100 µl de PBS se marcaron con 1 µl de una disolución etanólica 2,5 mM de ácido 1-pirenododecanoico (Life Technologies) durante 30 min a 37 °C. El exceso de ácido 1-pirenododecanoico se eliminó sedimentando y lavando dos veces con tampón MES (MES 0,2M, NaCl 150 mM, pH 5,5) mediante ultracentrifugación a 100.000 g durante 60 min.

Después de la eliminación del pireno libre, los exosomas marcados (10 µg de proteína total/pocillo) se suspendieron en tampón MES (MES 0,2M, NaCl 150 mM, pH 5,5) en una placa de 96 pocillos. El incremento en la fluorescencia del monómero después de la adición de iLNP no marcadas (5 µg de lípidos totales) se registró a 37 °C con un lector de microplacas Synergy HT (Biotek). Como se muestra en la FIG. 24, se produce una elevación en la señal del monómero una vez los exosomas se mezclan con las iLNP producidas por extrusión (ext) y chip microfluídico (mf).

5

#### Ejemplo 12

##### Vesículas extracelulares como módulos de administración biocompatibles para hibridosomas versátiles

La fusión entre microvesículas secretadas por diversos tipos de células, y diferentes iLNP se determinó por un ensayo de fusión con R18.

10 Como se muestra en el ejemplo 2, las microvesículas humanas se aislaron de plaquetas (PLT-MV) y neutrófilos polimorfonucleares (PMN-MV).

De forma análoga al Ejemplo 5, las muestras de microvesículas (proteína total de 0,25 µg de PLT-MVs y 1,2 µg de PMN-MV) se marcaron con disolución etanólica de R18, seguido de la eliminación del tinte libre. El incremento en la fluorescencia se monitorizó después de la adición de diferentes especies de iLNP.

15 Como se muestra en la FIG. 25, el mezclado de las iLNP con las PMN-MV en tampón de fusión dio lugar a desapantallamiento de R18. Se determinó una interacción dependiente del pH de iLNP con PMN-MV ya que la adición de las iLNP a pH 7,4 no dio lugar a desapantallamiento. El mezclado con pDNA-iLNP y BSA-iLNP dio lugar a desapantallamiento de R18.

20 Como se muestra en la FIG. 26, el mezclado de las PLT-MV y las iLNP vacías es dependiente del pH y similar al de las iLNP vacías y exosomas. Las PMN- y PLT-MV tienen un interés particular como BDM, debido a sus propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras. Se ha mostrado que las PMN-MV pueden inhibir la liberación de citoquinas (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1, interleuquina-8, interleuquina-10 e interleuquina-12p70) y reducen los receptores de la activación inmune (CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-DP, HA-DQ y HA-DR) en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (Sadallah, Eken, y Schifferli, 2011).

25

#### Ejemplo 13

##### Captación celular de hibridosomas en células difíciles de transfectar

Se usó microscopía fluorescente para determinar la captación celular de hibridosomas por una línea celular de linfocitos difícil de transfectar (Jeko1). Se prepararon hibridosomas a partir de MCL-exo e iLNP marcadas con NBD (formulación de iLNP DlinDMA:Col:DSPC:PEG-S-DMG:NBD-PC formulación 40:40:17,5:2:0,5). Se mezclaron MCL-Exo (2 µg de proteína total por pocillo) con iLNP marcadas con NBD (1 µg de lípidos totales por pocillo) en un tampón de reacción (MES 10 mM, pH 6,0, NaCl 145 mM, KCl 5 mM) y se incubó en un agitador durante 30 min a 37 °C.

30 Los hibridosomas y las iLNP se transfecionaron con células diana durante 1 h y después se lavaron dos veces con PBS para eliminar las vesículas unidas a la superficie y no internalizadas. Las células se resuspendieron entonces en PBS y se tomaron imágenes fluorescentes con ajustes idénticos del instrumento. La intensidad de fluorescencia media del tinte de la membrana de las iLNP por célula se determinó por análisis de imágenes en el software de código abierto ImageJ. Como se muestra en la FIG. 27, las células Jeko1 (n=160) presentaron una intensidad media casi 7 veces mayor del tinte de las membranas de las iLNP después de 1 h de transfección con hibridosomas que con las iLNP solas.

### Bibliografía

- Bao, G., Mitragotri, S., y Tong, S. (2013). Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15, 253-82. doi:10.1146/annurev-bioeng-071812-15240
- 5 Belliveau, N. M., Huft, J., Lin, P. J., Chen, S., Leung, A. K., Leaver, T. J., Cullis, P. R. (2012). Microfluidic Synthesis of Highly Potent Limit-size Lipid Nanoparticles for In Vivo Delivery of siRNA. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 1(mayo), e37. doi:10.1038/mtna.2012.28
- Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S., y Schifferli, J. a. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 218(3), 382-92. doi:10.1016/j.imbio.2012.05.021
- 10 EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., y Wood, M. J. a. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 347-57. doi:10.1038/nrd3978
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., y Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry*, 79(11), 4215-21. doi:10.1021/ac0702084
- Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., y MacLachlan, I. (2005). Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 107(2), 276-87. doi:10.1016/j.jconrel.2005.06.014
- 15 Marcus, M. E., y Leonard, J. N. (2013). FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals*, 6(5), 659-680. doi:10.3390/ph6050659
- Maurer, N., Wong, K. F., Stark, H., Louie, L., McIntosh, D., Wong, T., Cullis, P. R. (2001). Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. *Biophysical Journal*, 80(5), 2310-26. doi:10.1016/S0006-3495(01)76202-9
- 20 Sadallah, S., Eken, C., Martin, P. J., y Schifferli, J. a. (2011). Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. *Journal of Immunology*, 186(11), 6543-52. doi:10.4049/jimmunol.1002788
- Sadallah, S., Eken, C., y Schifferli, J. a. (2011). Ectosomes as immunomodulators. *Seminars in Immunopathology*, 33(5), 487-95. doi:10.1007/s00281-010-0232-x
- 25 Semple, S. C., Akinc, A., Chen, J., Sandhu, A. P., Mui, B. L., Cho, C. K., Hope, M. J. (2010). Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature Biotechnology*, 28(2), 172-6. doi:10.1038/nbt.1602
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, Capítulo 3, Unidad 3.22. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
- 30 Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., y Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(7), 940-8. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.017.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para fabricar un vehículo biocompatible híbrido (hibridosoma), comprendiendo dicho proceso:
  - (a) proporcionar una primera vesícula que comprende una membrana y uno o más agentes terapéuticos y/o de diagnóstico encapsulados en dicha primera vesícula, en donde dicha primera vesícula se ha producido *in vitro*, en donde dicha primera vesícula se selecciona del grupo que consiste en nanopartículas basadas en lípidos (LNP), liposomas, LNP estabilizadas con polímero, cerasomas, esfingosomas, niosomas, polimersomas, LNP estabilizadas con nanopartículas sintéticas, nanopartículas híbridas con núcleo-cubierta de lípido-polímero, LNP derivadas de membrana naturales, y LNP recubiertas con membranas naturales, y en donde dicha primera vesícula comprende al menos un resto fusogénico que permite o potencia la disrupción de una membrana o mezclado de lípidos entre una membrana y una bicapa lipídica,
  - en donde el al menos un resto fusogénico es un lípido catiónico ionizable que tiene al menos un grupo protonable o desprotonable, de manera que el lípido está cargado positivamente a un pH a o por debajo del pH fisiológico, y es neutro a o por encima del pH fisiológico;
  - (b) proporcionar una segunda vesícula que comprende una bicapa lipídica, que se produce *in vivo* y se libera en el entorno extracelular; y
  - (c) poner en contacto dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula a un pH por debajo de 7,4 y a una temperatura de entre 0 °C y 60 °C, uniendo de esta manera dicha primera vesícula con dicha segunda vesícula y produciendo dicho hibridosoma.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el contacto se realiza en un tampón que tiene un pH entre 4 y 6.
3. El proceso según la reivindicación 1, en donde el contacto se realiza a una temperatura de reacción de 37 °C.
4. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho lípido catiónico ionizable se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dilinoleoxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il4-(dimetilamino)butanoato (DLin-MC3-DMA), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), YSK05, ácido 4-(((2,3-bis(oleoiloxi)propil)-(metil)amino)metil)benzoico (DOBAT), N-(4-carboxibencil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOBAQ), ácido 3-((2,3-bis(oleoiloxi)propil)(metil)amino)propanoico (DOPAT), N-(2-carboxipropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)-propan-1-amino (DOMPAQ), N-(carboximetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(oleoiloxi)propan-1-amino (DOAAQ), Alny-100, 3-(dimetilamino)-propil(1Z,15Z)-3-[ (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-il]-henicos-12,15-dienoato (DMAP-BLP).
5. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha primera vesícula comprende un resto de direccionamiento, en donde el resto de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, péptidos, proteínas, aptámeros, oligonucleótidos y polisacáridos.
6. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha primera vesícula comprende un lípido modificado con PEG.
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde dicho lípido modificado con PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG-fosfolípido, fosfatidiletanolamina modificada con PEG (PEG-PE), ceramidas modificadas con PEG, dialquilmáginas modificadas con PEG, diacilgliceroles modificados con PEG, polietilen glicol dipalmitoilglicerol (PEG-DPG), dialquilgliceroles modificados con PEG, (metoxi polietilen glicol)-dimiristolglicerol (PEG-s-DMG), un PEG-dialquiloxypropilo (DAA), R-3-[( $\omega$ -metoxi-poli(etilenglicol)2000)carbamoi]-1,2-dimiristiloxypropil-3-amino (PEG-c-DOMG), y N-acetilgalactosamina-((R)-2,3-bis(octadeciloxi)propil-1(metoxi-poli(etilene glicol)2000)propilcarbamato)) (GalNAc-PEG-DSG).
8. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho uno o más agentes terapéuticos se seleccionan de:
  - (i) un fármaco o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
  - (ii) un agente terapéutico basado en anticuerpo;
  - (iii) un péptido, o una proteína, y
  - (iv) un ácido nucleico.
9. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho agente terapéutico es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARN antisentido, micro ARN (miARN), ARN en horquilla pequeño o corto (ARNsh), ARN guía (ARNg), ARN con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente

(ARNcr), ARN con repeticiones palindrómicas cortas agrupadas interespaciadas regularmente de activación en trans (ARNtracr), oligonucleótidos inmunoestimuladores, plásmidos, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas.

10. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha primera vesícula comprende una molécula de ácido nucleico y/o ARNm modificada que codifica al menos un antígeno.

5 11. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha segunda vesícula comprende un antígeno asociado con una enfermedad seleccionado de un antígeno asociado con tumor y un antígeno asociado con patógeno.

12. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho agente de diagnóstico es un radioisótopo que incluye uno o más radionúclidos seleccionados del grupo que consiste en  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{3}\text{H}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{130}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117}\text{Lu}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{88}\text{Y}$  e  $^{90}\text{Y}$ .

10 13. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho agente de diagnóstico se selecciona de un punto cuántico, y una nanopartícula de metal seleccionada de una nanopartícula de oro o plata.

14. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha segunda vesícula deriva de:

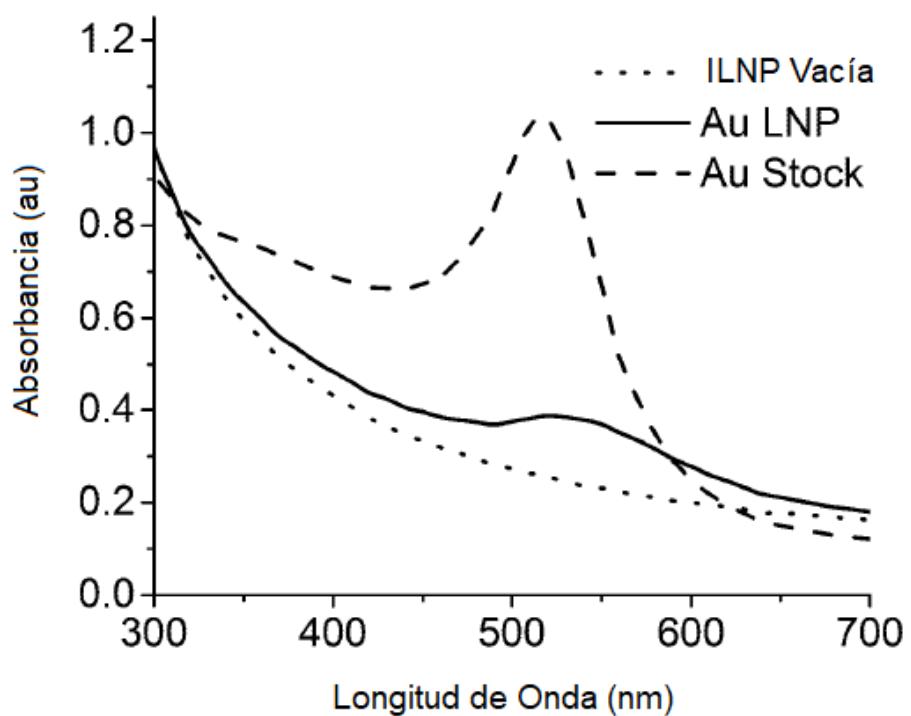
(i) una célula tumoral de un paciente con cáncer o precáncer, o deriva de una línea de células tumorales o cancerosas;

15 (ii) una célula de glioblastoma o una célula de linfoma de células del manto;

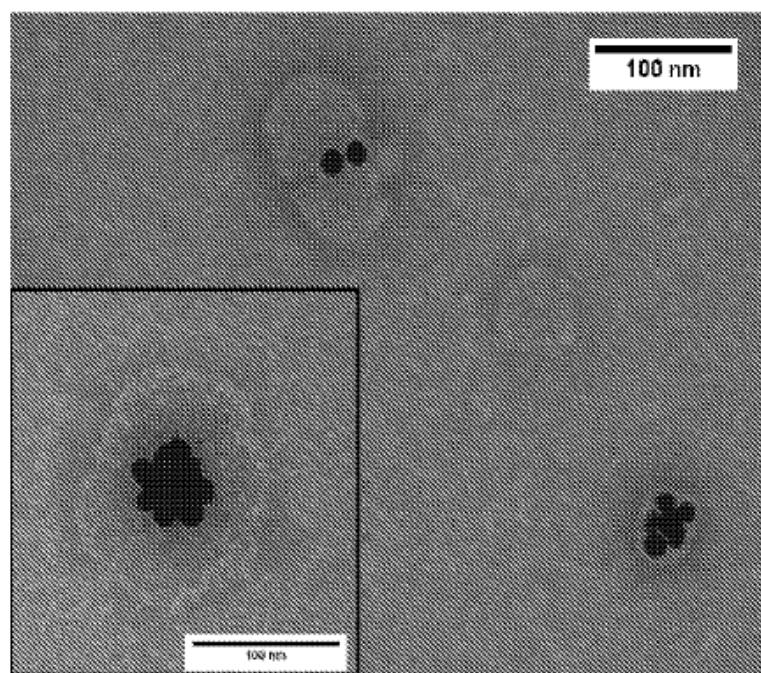
(iii) una célula seleccionada del grupo que consiste en células B, células presentadoras de antígenos, linfocitos, trombocitos, neutrófilos, neutrófilos polimorfonucleares activados y leucocitos;

(iv) un patógeno seleccionado de un grupo que consiste en un patógeno bacteriano, patógeno amebiano, patógeno parasitario o patógeno fúngico; o

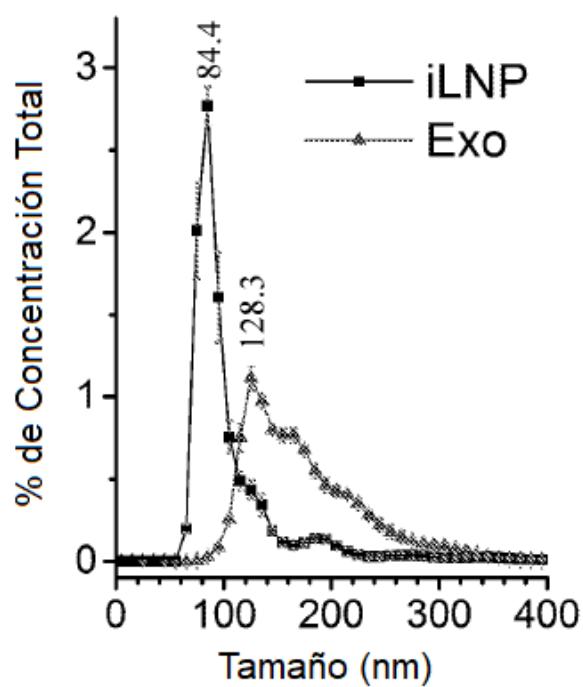
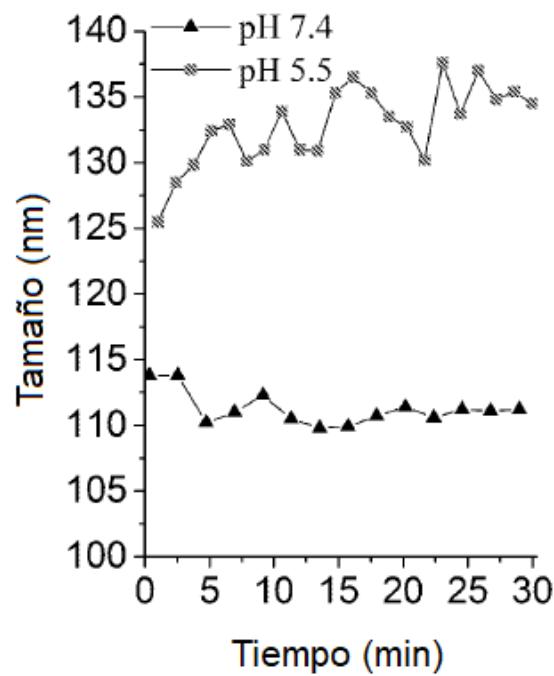
20 (v) una célula infectada con patógeno.

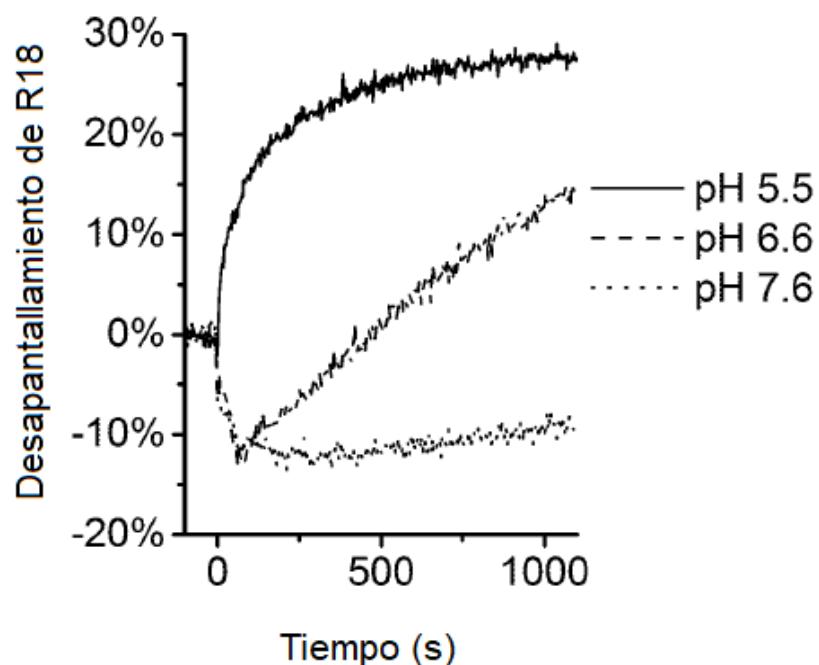
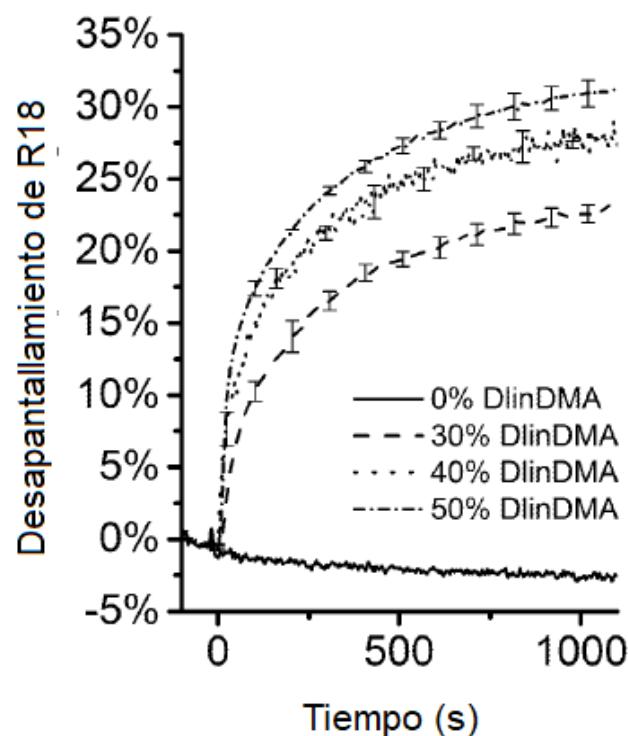


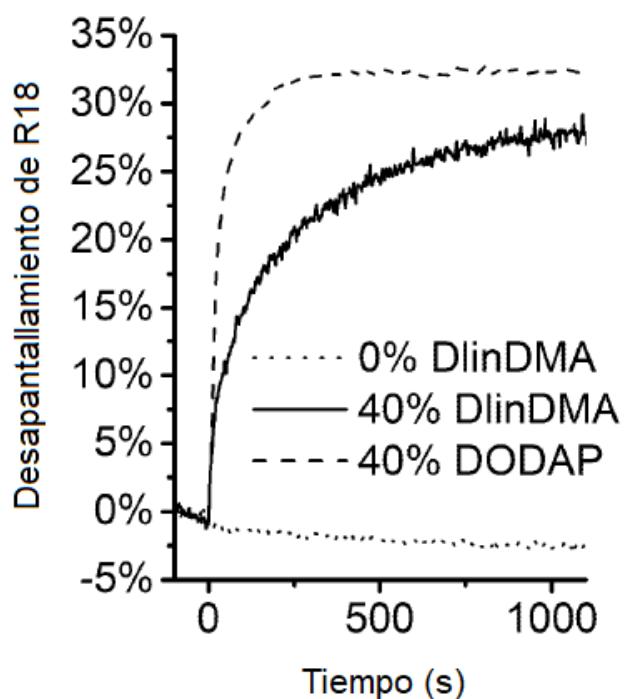
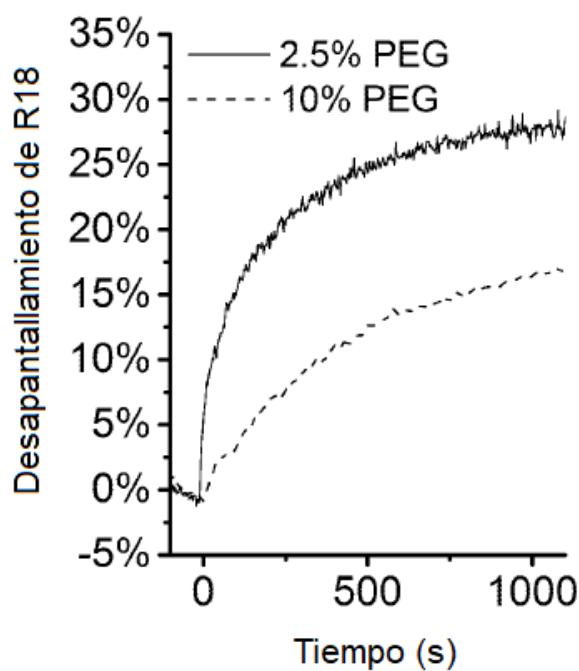
**FIG. 1**

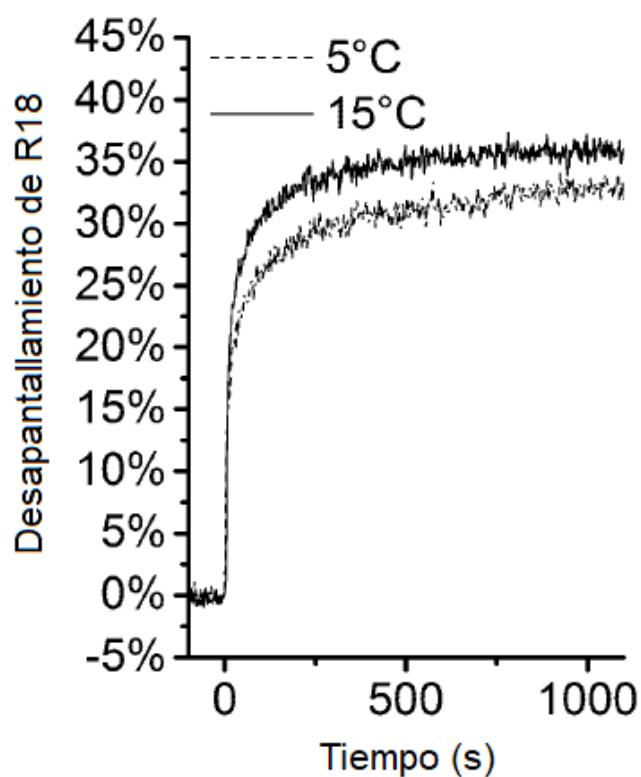
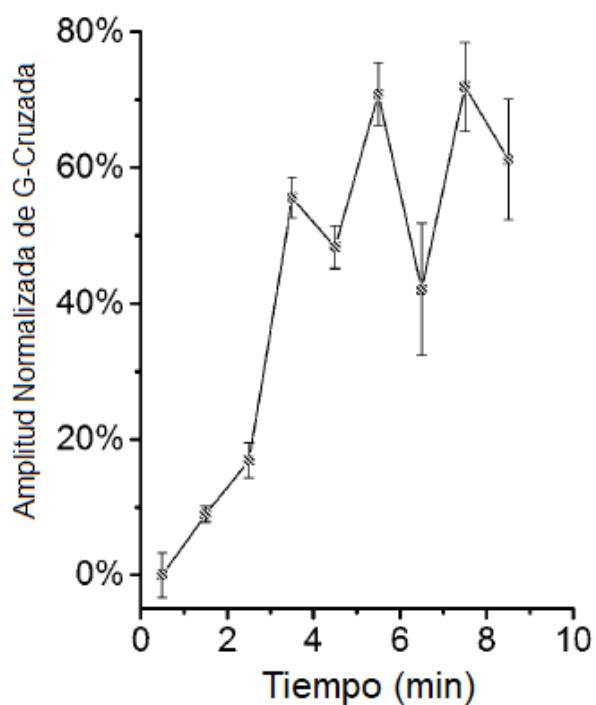


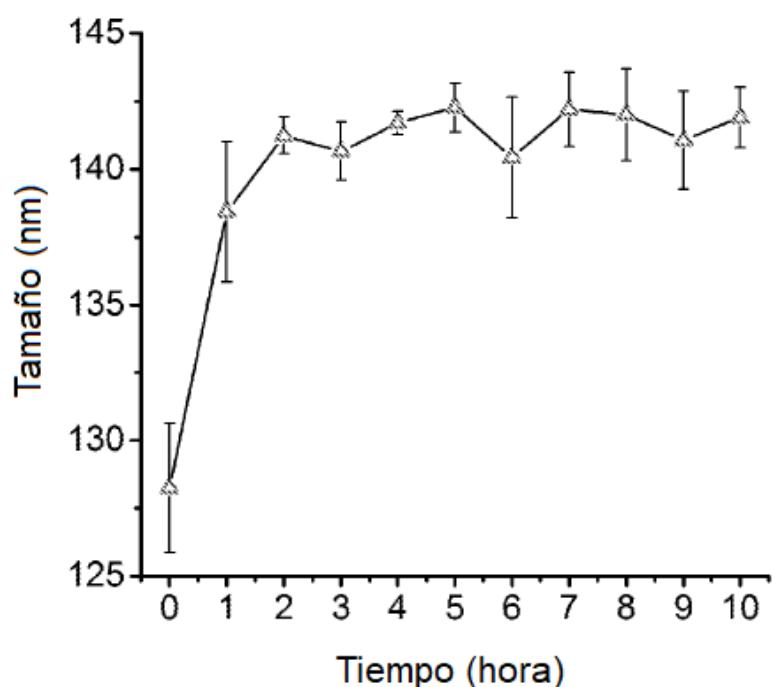
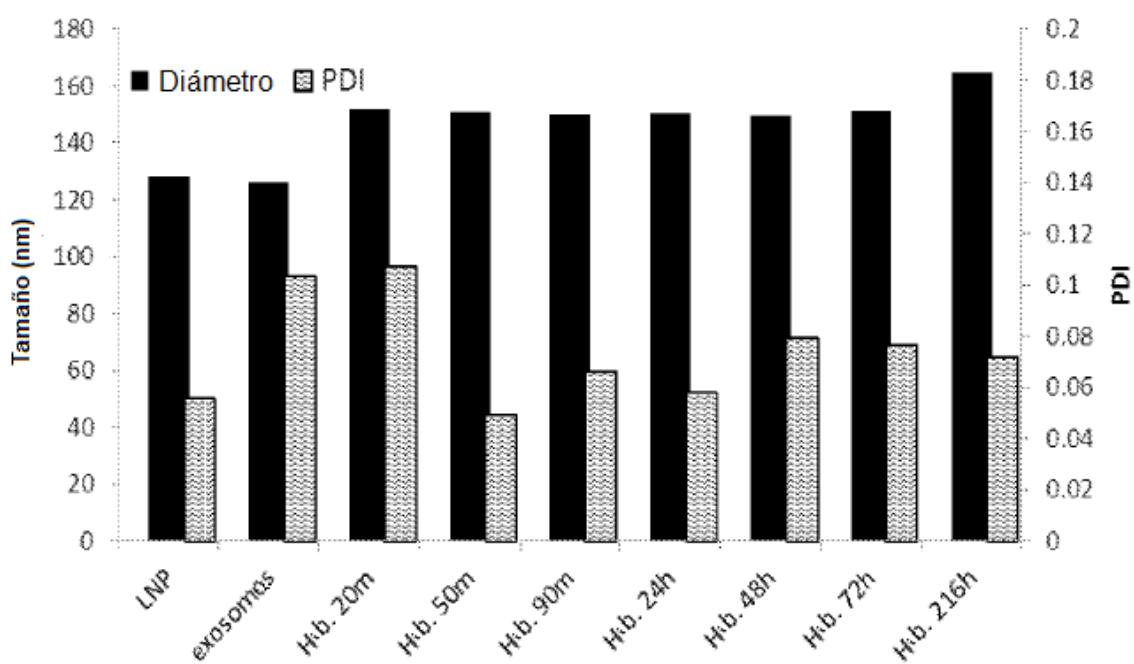
**FIG. 2**

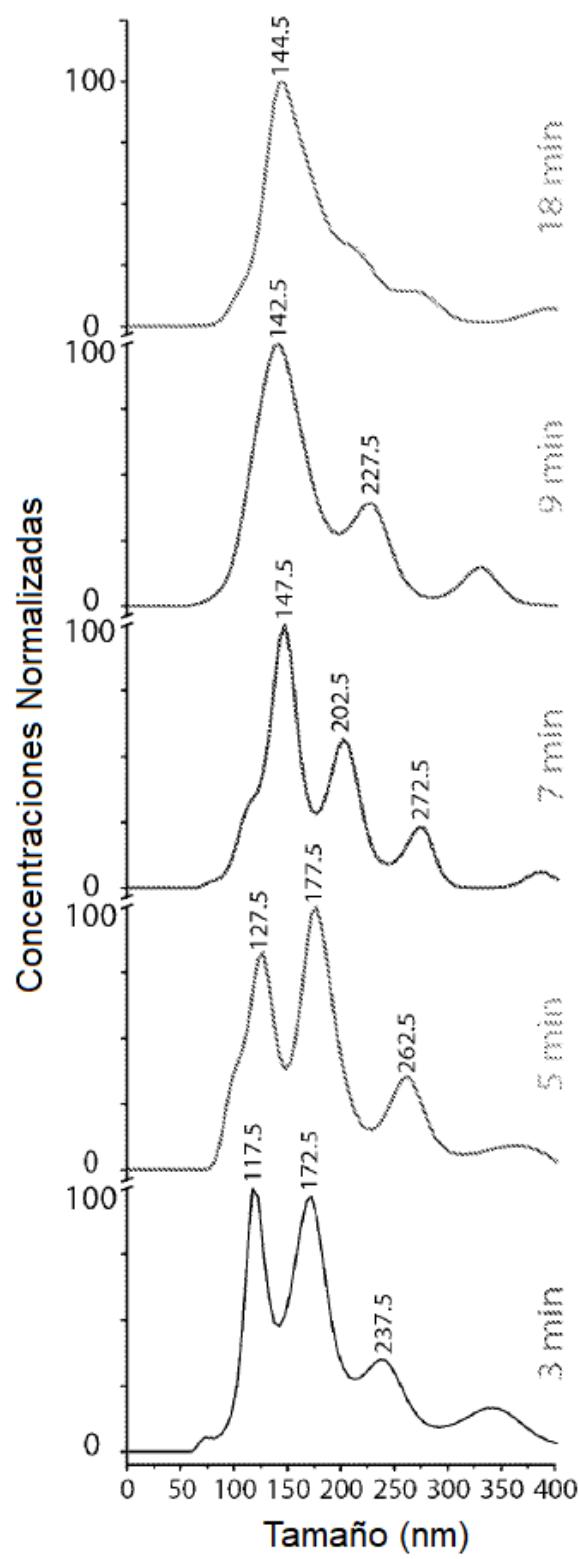
**FIG. 3****FIG. 4**

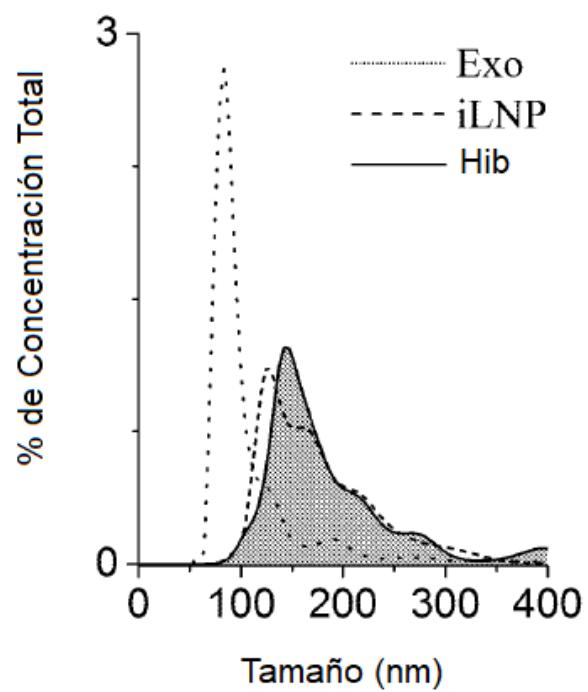
**FIG. 5****FIG. 6**

**FIG. 7****FIG. 8**

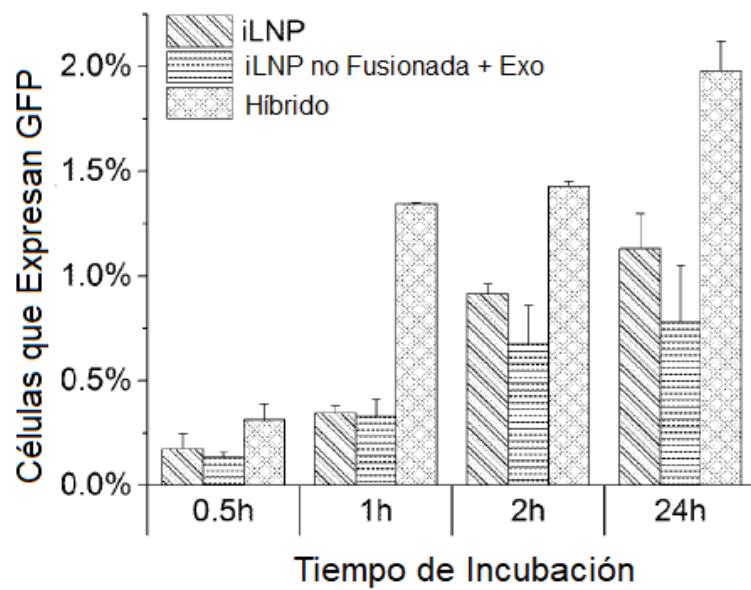
**FIG. 9****FIG. 10**

**FIG. 11****FIG. 12**

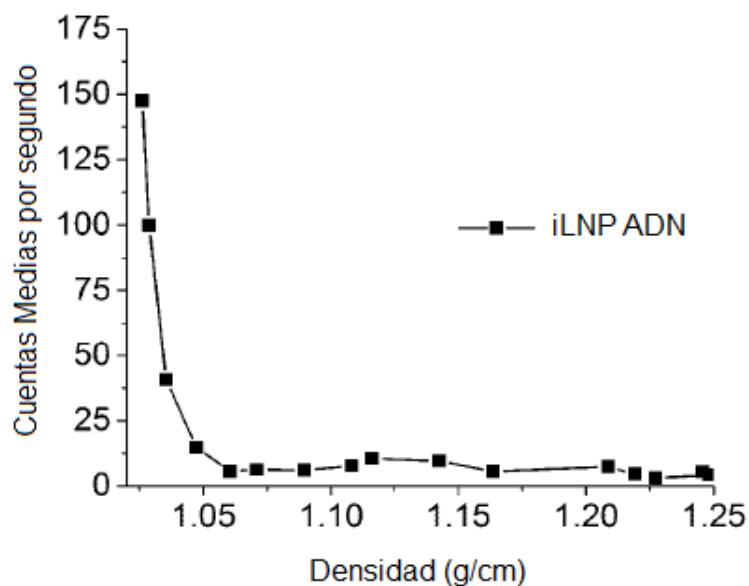
**FIG. 13**



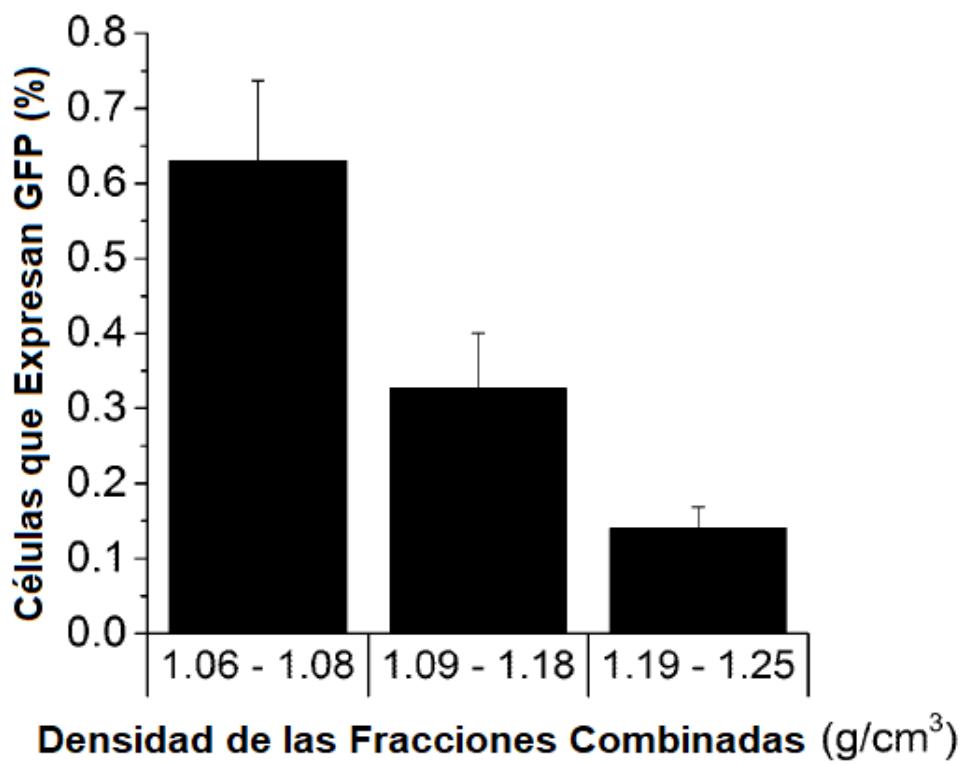
**FIG. 14**



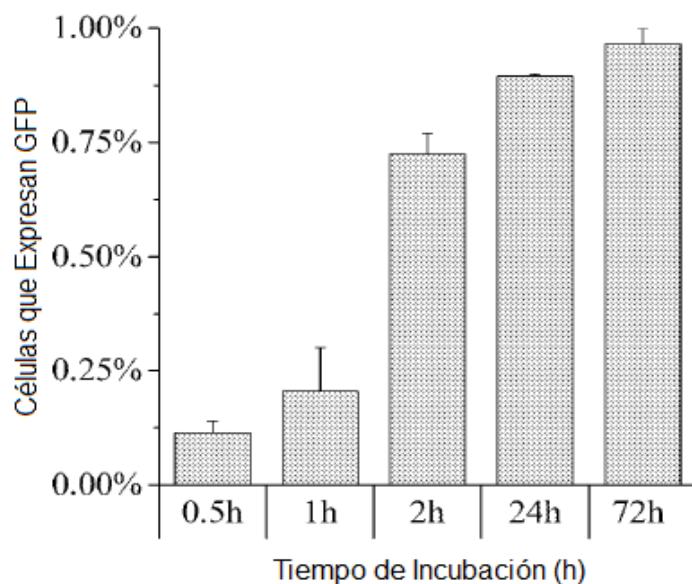
**FIG. 15**



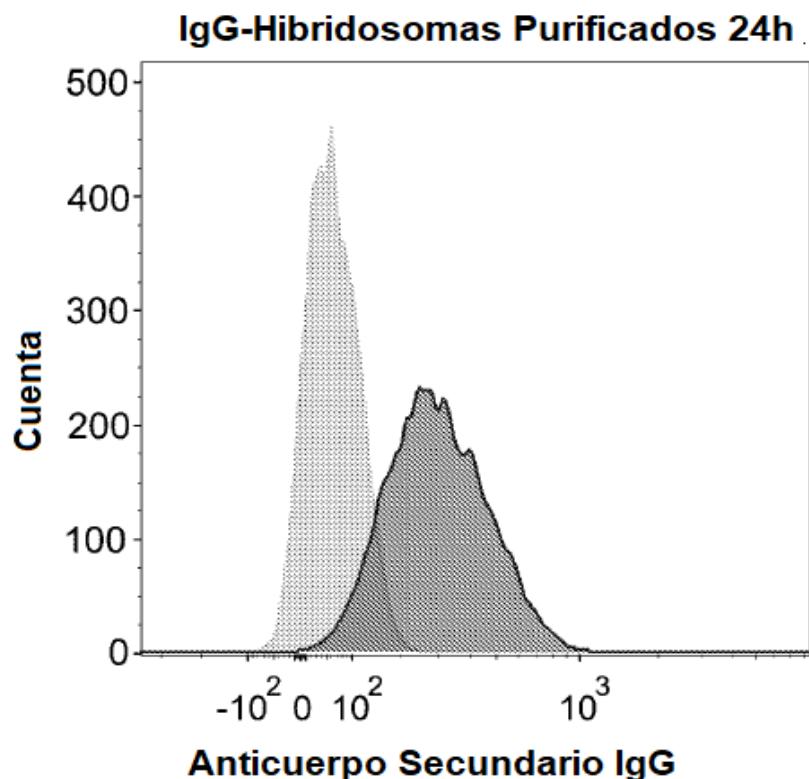
**FIG. 16**



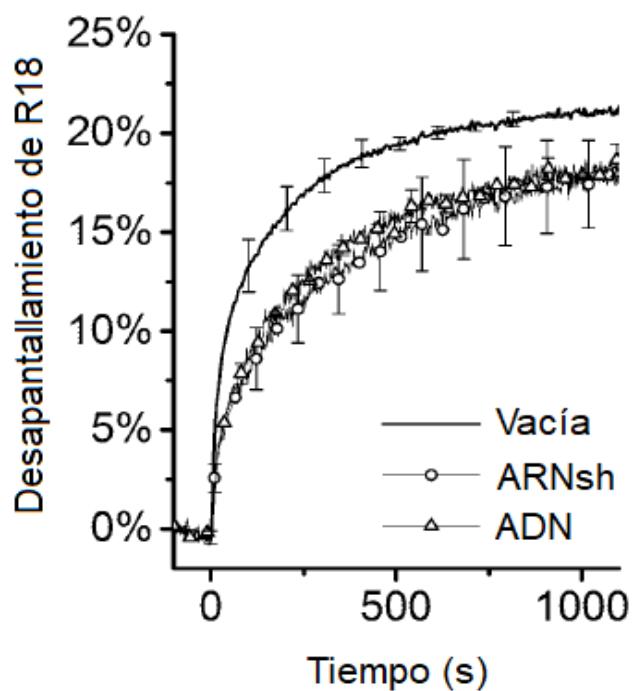
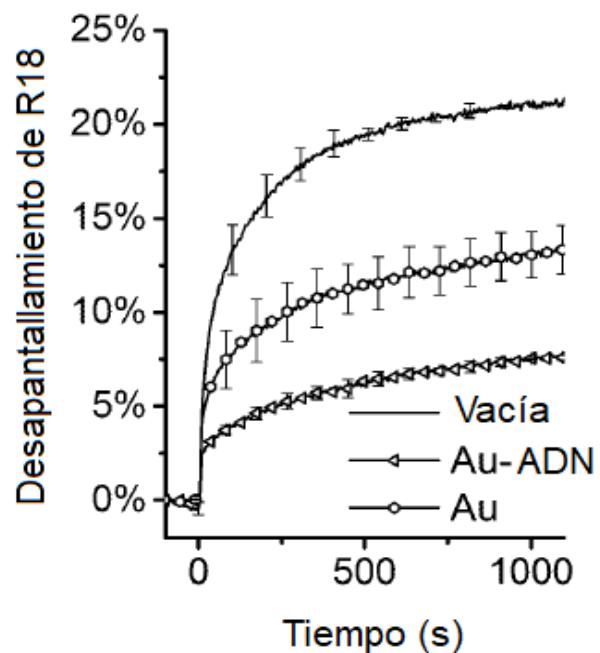
**FIG. 17**

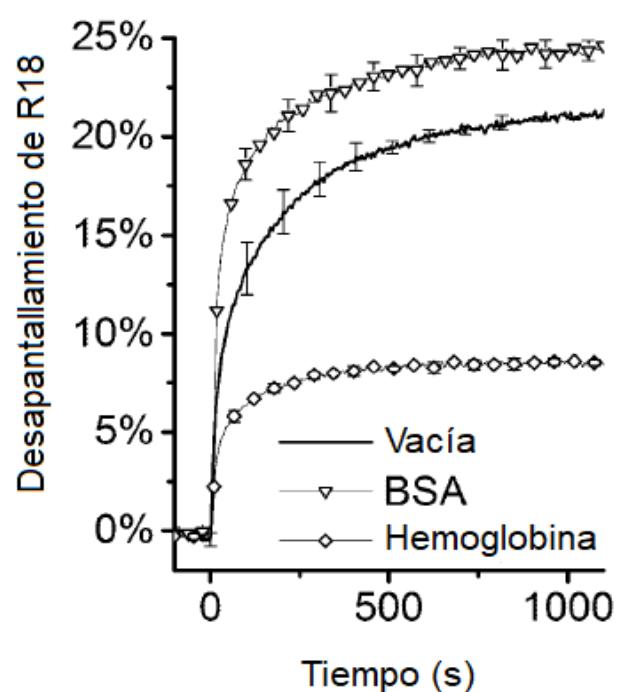
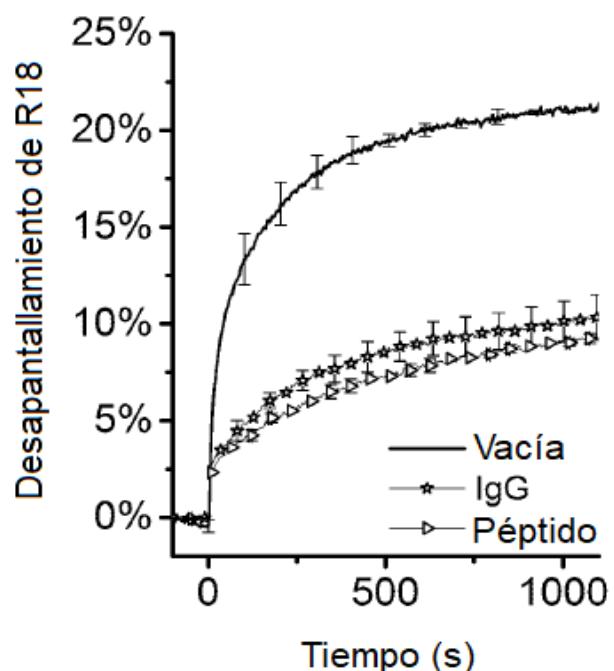


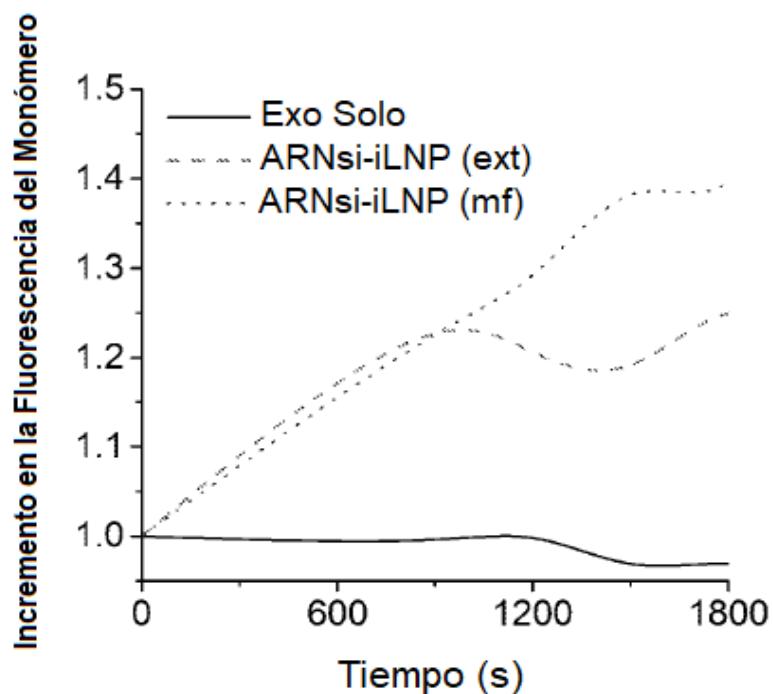
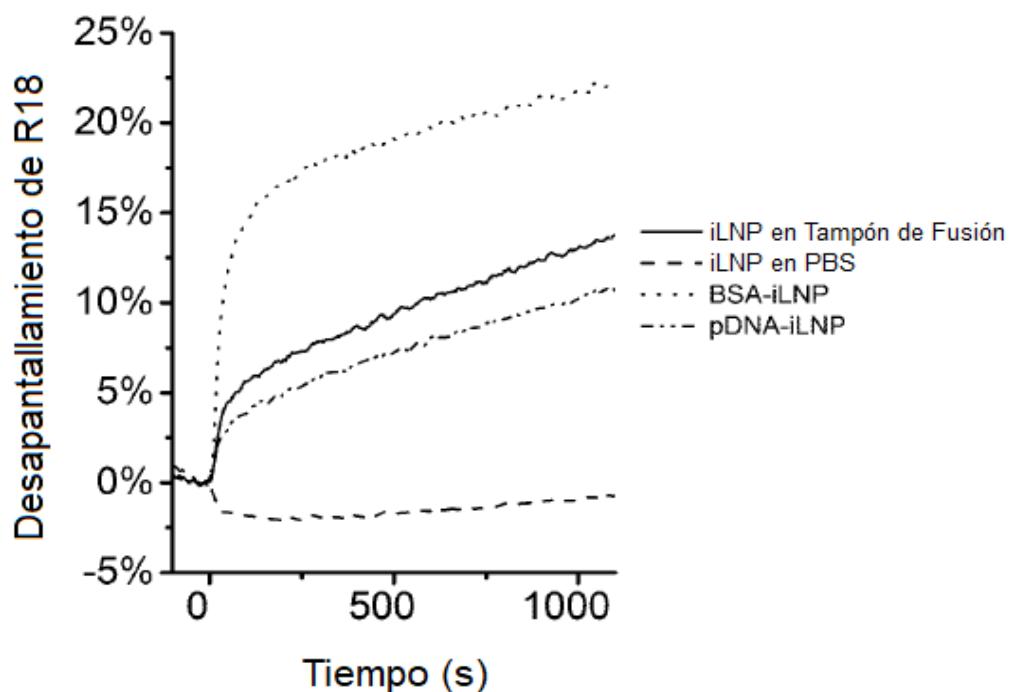
**FIG. 18**

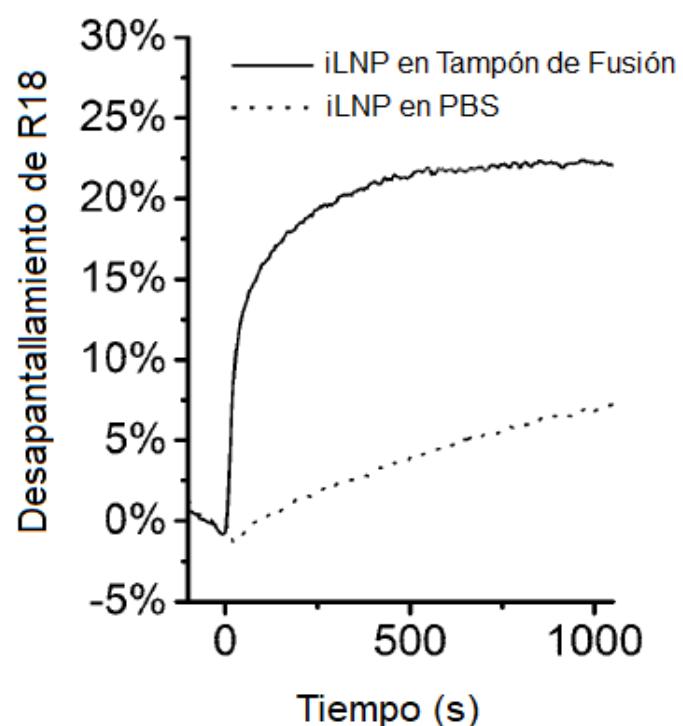


**FIG. 19**

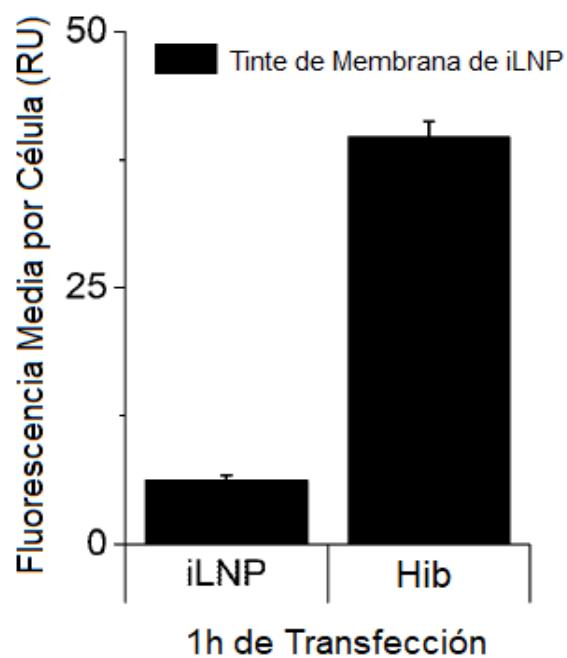
**FIG. 20****FIG. 21**

**FIG. 22****FIG. 23**

**FIG. 24****FIG. 25**



**FIG. 26**



**FIG. 27**