



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 860**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 33/30 (2006.01)

A61K 33/34 (2006.01)

C08L 101/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08707738 .4**

96 Fecha de presentación : **15.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2131822**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **Sistema de nano-transporte con carga de iones metálicos divalentes con arquitectura dendrítica, útil para su utilización en terapias.**

30 Prioridad: **16.02.2007 EP 07003315**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es: **Freie Universität Berlin
Kaiserswerther Strasse 16-18
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Multhaup, Gerd;
Haag, Rainer;
Treiber, Carina y
Quadir, Mohiuddin, Abdul**

74 Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de nano-transporte con carga de iones metálicos divalentes con arquitectura dendrítica, útil para su utilización en terapias.

La presente invención se refiere a un nanovehículo con una estructura dendrítica, compuesto por un núcleo dendrítico y al menos dos revestimientos para el encapsulamiento no covalente y/o transporte de iones metálicos divalentes, preferiblemente iones Cu- o Zn(II), para su utilización en un método de tratamiento de un problema terapéutico relacionado con el transporte de iones metálicos divalentes. La presente invención también hace referencia a una composición farmacéutica que contiene dicho sistema de nanotransporte de iones metálicos divalentes, como iones Cu- o Zn(II) en un formato encapsulado no covalente. Los usos terapéuticos preferidos para este sistema de nanotransporte de iones metálicos divalentes en un formato encapsulado no covalente son las terapias de la Enfermedad de Alzheimer (AD) o la Enfermedad de Menkes.

La generación de nanocompartimentos para la formación homogénea de complejos y la disolución de agentes activos constituyó un problema no resuelto para muchas aplicaciones, por ejemplo, en catálisis, suministro de medicamentos y formulación de tintas, entre otras. Los sistemas de transporte supramoleculares pueden dividirse en dos clases (a) agregados físicos de moléculas anfífilas como vesículas o micelas, y (b) arquitecturas moleculares unidas mediante enlaces covalentes, los denominados sistemas de transporte monomoleculares. No obstante, un problema fundamental de todos estos sistemas de transporte fue su limitada compatibilidad matricial. Pueden transportar moléculas no polares en un entorno no acuoso o, cuando el sistema se basa en una arquitectura micelar invertida, transferir moléculas polares en un entorno hidrófobo, como un medio orgánico.

La generación de nanocompartimentos compatibles con diversos entornos resolvió muchos problemas de solubilidad y estabilidad de los agentes activos. De este modo, las nanopartículas de diseño, especialmente aquellas que cuentan con una arquitectura de núcleo/revestimiento han encontrado posibles aplicaciones en el ámbito de la biología y la terapéutica. Estas estructuras están formadas por la modificación covalente de las macromoléculas dendríticas con un revestimiento adecuado, que da como resultado estructuras estables tipo micela (Haag, Angew. Chem. 116 (2004), 280-4; Haag, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004), 278-82). Estas arquitecturas moleculares son adecuadas para la encapsulación no covalente de moléculas huésped, cuyas dimensiones varían entre iónicas y moleculares. Recientemente, se ha descrito un concepto sencillo y general para la generación de arquitecturas tipo núcleo-revestimiento a partir de unos materiales iniciales fácilmente disponibles, con el fin de suministrar el medicamento y las moléculas bioactivas relacionadas a los tejidos objetivo (WO 2006/018295; Krämer et al., Macromolecules 38 (2005), 8308-15; Radowski et al., Angew. Chem. 119 (2007), 1287-1292). Se han concebido dos tipos de arquitecturas que conllevan un revestimiento (nanopartículas revestimiento-núcleo, CS NP) o múltiples revestimientos (nanopartículas núcleo-multirevestimiento, CMS NP) fijados a un núcleo dendrítico de poliamina, como se muestra en la Figura 1. En el caso de las CMS NP, se han utilizado cadenas de alquilo y glicol de polietileno (PEGs) con diferentes longitudes de cadena para el revestimiento interior y exterior, respectivamente. Estos dos tipos de nanopartículas, a pesar de tener diferentes estructuras, poseen un tamaño comparable y ambas muestran una fuerte afinidad a la hora de formar complejos con una amplia variedad de moléculas huésped.

El Documento WO 2006/115547 A2 se refiere a polímeros dendríticos con una amplificación y una funcionalidad interior mejoradas.

El documento EP 0 928 813 A1 se refiere a redes basadas en polímeros dendríticos consistentes en dominios hidrófilos y oleófilos bien definidos y que son capaces de actuar como esponjas nanoscópicas para grupos invitados electrófilos.

El documento EP 1 278 061 A1 se refiere a sensores químicos procedentes de materiales compuestos por nanopartículas/dendrimeros. Estos sensores químicos comprenden una película sensible formada por una red de nanopartículas en la que las nanopartículas están interconectadas mediante moléculas dendrímeras funcionalizadas.

Se ha descrito una perturbación de homeostasis de ión metálico, durante el envejecimiento, en ratones y humanos. Además, se ha demostrado que la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD) está asociada al agotamiento del Cu- del cerebro. Existen otras enfermedades humanas asociadas a síntomas neurodegenerativos, como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), la enfermedad de Parkinson y otros trastornos del transporte del Cu, como la enfermedad de Wilson y Menkes. El transporte y el metabolismo celular del Cu depende de una serie de proteínas de membranas y de proteínas solubles de menor tamaño que comprenden un sistema de funcionalidad integrado para el mantenimiento de la homeostasis del Cu- celular. No obstante, hasta ahora, el tratamiento de estas enfermedades mediante la aplicación de iones Cu- era muy limitado, a causa de los problemas de solubilidad.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención consiste en facilitar un medio que permita el suministro eficaz de iones metálicos, como los iones Zn(II) e iones Cu- al órgano o tejido objetivo deseado.

De acuerdo con la invención, esto se logra mediante los objetos definidos en las reivindicaciones.

Durante los experimentos conducentes a la presente invención, se descubrió que los sistemas de nanotransporte ofrecen una posibilidad de sortear el sistema de absorción de los iones metálicos celulares (por ejemplo, Cu) para conseguir unas concentraciones locales mayores en comparación con la absorción celular normal y para superar no sólo los efectos de la deficiencia de Cu en ciertas enfermedades, como la AD, sino también las deficiencias de otros iones metálicos divalentes, como Zn(II) en tejidos o tipos de célula específicos.

El metabolismo de transporte y celular del Cu depende normalmente de una serie de proteínas de la membrana y de proteínas citoplásmicas solubles más pequeñas que comprenden un sistema de funcionalidad integrado para el mantenimiento de la homeostasis celular del Cu . El recorrido habitual de la absorción del Cu implica una reducción de Cu(II) a Cu(I) con anterioridad a la transferencia a través de la membrana (Aller and Unger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006), 3627-32). El exceso de cobre resulta altamente tóxico al causar tensiones oxidativas mediante la reacción de Fenton, y por tanto, provoca daños en las proteínas, el ADN y los lípidos. Los sistemas de nanotransporte de la presente invención no sólo proporcionan un sistema excelente para el estudio de la importación del Cu en la célula evitando los mecanismos celulares normales, sino también el efecto del Cu en compartimentos celulares específicos, dirigiendo a compartimientos individuales sistemas de transporte cargados con Cu- . Se pudieron demostrar el aporte específico de Cu a través de las membranas celulares al objetivo intracelular y los emplazamientos de almacenamiento. De este modo, el transporte de los medios de transporte de Cu- a través de la barrera hemato-cerebral puede conseguirse mediante los sistemas de nanotransporte, a fin de solventar la deficiencia de Cu del cerebro en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

En su conjunto, se han identificado nanovehículos que transportan específicamente su carga a través de las membranas celulares y a subestructuras celulares específicas. Estos datos desvelan una novedosa función biológica de los nanovehículos en el transporte celular de iones metálicos.

De este modo, la presente invención se refiere a la utilización de un nanovehículo con una estructura dendrítica, que está compuesto por un núcleo dendrítico y al menos uno, y preferiblemente dos revestimientos para la encapsulación no covalente y/o el transporte de iones metálicos divalentes, preferiblemente iones Cu o iones Zn(II) .

La "estructura dendrítica" se consigue mediante la utilización de polímeros dendríticos. Dichos dendríticos, así como los métodos de producción de estos compuestos se describen, por ejemplo, en Haag, Angew. Chem. 119 (2007) 1287-1292; Haag, Angew. Chem. 114 (2002), 4426-31; WO 02/077037; WO 03/037383 y US 2002/0187199.

Se describen métodos para la preparación de nanovehículos, por ejemplo, en el Ejemplo 1 a continuación, así como en WO 2006/018295. Estos documentos también describen nanopartículas cuya estructura resulta especialmente útiles para los fines de la presente invención.

La carga de los nanovehículos con iones metálicos puede efectuarse mediante métodos rutinarios; véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 a continuación. Preferiblemente, las nanopartículas se producen siguiendo un método modular, utilizando elementos de construcción baratos y disponibles comercialmente, como polietileno(imina) hiper-ramificado (PEI), ácidos dicarboxílicos y monometil del glicol de polietileno (mPEG). Los núcleos hiper-ramificados pueden funcionalizarse con elementos de construcción anfífilos lineales formados por ácidos alquílicos (por ejemplo, C_6 , C_{12} o C_{18}) conectados a ésteres del monometil del glicol de polietileno (mPEG, por ejemplo, con una media de 6, 10 y 14 unidades de glicol).

En una realización preferida del uso de la invención, el revestimiento interior de la nanopartícula es hidrófilo. Especialmente se prefieren los revestimientos exteriores que comprenden (o consisten en) cadenas de monometil del glicol de polietileno monometil éster (mPEG).

En una realización preferida adicional del uso de la invención, el revestimiento interior de la nanopartícula es no polar. Se prefieren especialmente los revestimientos interiores que comprenden (o consisten en) cadenas alifáticas largas. Incluso se prefieren especialmente las cadenas alifáticas con una longitud de C_2 - C_{40} .

El núcleo puede estar formado por diversos polímeros dendríticos, como poliglicerol, poliamida, poliamina, poliéter o poliéster. En una realización especialmente preferida del uso de la presente invención, el núcleo dendrítico de la nanopartícula comprende (o consiste en) polietileno(imina) hiper-ramificado (PEI).

En una realización especialmente preferida del uso de la presente invención, el núcleo dendrítico se funcionaliza con elementos de construcción anfífilos formados por diácidos alquílicos conectados a monometil-ésteres del glicol de polietileno.

5 Se ha demostrado que para la encapsulación de iones de Cu o Zn(II) basta con una funcionalización de los polímeros dendríticos inferior al 100%. Preferiblemente, el grado de funcionalización oscila entre 70% y 100%.

10 En una realización adicional especialmente preferida del uso de la presente invención, la nanopartícula **se caracteriza porque** es capaz de liberar los iones metálicos divalentes encapsulados después de reducir el valor del pH. El valor fisiológico del pH del tejido normal es 7,4, pero es de 5,0 a 6,0 en tejidos patológicamente inflamados, como es el caso de los cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer o de los tejidos tumorales. El descenso del valor del pH es suficiente para romper los grupos (preferiblemente, grupos imina) mediante los cuales los revestimientos exteriores están fijados a la estructura del núcleo, así como para captar protones de los grupos funcionales (preferiblemente, grupos amino) de la estructura del núcleo, produciéndose de este modo la liberación de la carga metálica.

A los efectos de la presente invención, los nanovehículos pueden ser unimoleculares o estar presentes en forma de agregados diferentes.

20 Las dimensiones de los nanovehículos dependen del uso específico previsto. Debe prestarse atención al hecho de que el tamaño de los nanovehículos no inhiben la eliminación a través de los riñones. El promedio preferido de pesos moleculares del nanovehículo oscila entre 10.000 y 250.000 g/mol (lo que corresponde a un promedio de diámetro de partícula de 3 a 7 nm).

25 La presente invención también se refiere a un sistema de nanovehículos como el definido anteriormente, que transporta iones metálicos, preferiblemente iones Cu o iones Zn(II) en un formato encapsulado no covalente, así como a una composición farmacéutica que contiene dicho sistema de nanovehículos, y opcionalmente, a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Toda persona versada en la materia conocerá vehículos adecuados, así como la formulación de dichas preparaciones farmacéuticas. Entre los vehículos adecuados destacan, por ejemplo, soluciones salinas comunes con tampón de fosfato, agua, emulsiones, como emulsiones formadas por agua y aceite, agentes humidificadores, soluciones estériles, etc. La preparación farmacéutica acorde con la invención puede estar disponible en forma de una solución inyectable, comprimidos, pomadas, suspensión, emulsión, supositorio, etc. También puede administrarse en forma de depósito (microcápsulas, sales de zinc, etc.). La vía de administración de la preparación farmacéutica depende entre otras cosas del tipo o tamaño del nanovehículo que transporta la sustancia activa; puede efectuarse por vía oral o parenteral. Los métodos de administración parenteral comprenden las vías tópica, intra-arterial, intra-muscular, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, transdérmica o transmucosal (nasal, vaginal, rectal, y sublingual) La administración también puede efectuarse mediante microinyección. La dosis adecuada será determinada por el facultativo encargado del caso, y dependerá de diversos factores, como la edad, el sexo o el peso del paciente, el tipo y grado de avance de la enfermedad, por ejemplo, la AD, la vía de administración, etc.

Por último, la presente invención se refiere a diversos usos de los nanovehículos descritos anteriormente:

45 (a) utilización de un nanovehículo de acuerdo con la definición anterior, que transporte iones Cu en un formato encapsulado no covalente para la preparación de una composición farmacéutica indicada para ralentizar el envejecimiento;

(b) utilización de un nanovehículo de acuerdo con la definición anterior, que transporte iones Cu en un formato encapsulado no covalente para la preparación de una composición farmacéutica indicada para el tratamiento de un trastorno del transporte de los iones Cu; entre los ejemplos de dichos trastornos se encuentran la enfermedad de Alzheimer (AD) o la Enfermedad de Menkes;

50 Breve descripción de las Figuras

Figura 1 a: nanopartículas de núcleo-revestimiento (CS NP) (izquierda) y nanopartículas de núcleo-multirevestimiento (CMS NP) (derecha) y su carga con moléculas pigmentadas o iones metálicos.

Figura 1 b: Estructura de los nanovehículos CS NP (izquierda) y CMS NP (derecha).

Figura 2: absorción de Cu mediada por nanopartícula en células SY5Y. El tratamiento con CS NP o CMS NP incrementó ligeramente la concentración de cobre intracelular de células del neuroblastoma humano SY5Y sin cargar previamente las partículas con Cu adicional (a la izquierda, nanopartícula no cargada con Cu). Partículas con Cu encapsulado a partir de un medio normal.

La preincubación de las nanopartículas con cobre adicional tuvo como resultado un importante incremento de la concentración de cobre intracelular (derecha, partícula cargada con Cu). El CMS-NP demostró ser más eficiente que el CS-NP a la hora de aumentar los niveles de cobre intracelular.

5 Figura 3: Microscopía de barrido por láser (LSM) utilizando nanopartículas etiquetadas con Cy3.

Figura 4. El vehículo CS-Gly (KA82) está específicamente orientado al núcleo de las células del neuroblastoma SY5Y.

10 Figura 5: Representación esquemática del diseño experimental correspondiente al análisis de la capacidad de las nanopartículas de sobrepasar la barrera hemato-cerebral en células primarias endoteliales de rata.

Figura 6: Espectrometría de masas de acoplamiento inductivo y espectrometría para la detección de transporte de oxígeno activo en células primarias endoteliales de rata.

15 (A) Transporte de cobre activo, (B) transporte de nanopartículas activas.

Figura 7: Actividad de las enzimas anti-oxidativas tras el tratamiento con Cu, con nanopartículas o con nanopartículas cargadas con Cu.

20 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Métodos generales

25

-Formación de complejos metálicos de nanovehículos

Las nanopartículas se obtuvieron mediante los métodos descritos. CS NP (Krämer et al., *Macromolecules* 38 (2005), 8308-15, CMS NP (Radowski et al., *Angew. Chem.* (119) 2007, 1287-92). Se utilizaron técnicas como la Calorimetría isotérmica de titulación (ITC) y la espectroscopia UV-para demostrar y cuantificar los procesos de encapsulación. La técnica ITC se ha utilizado para seguir las interacciones entálpicas entre los nanotransportadores y los iones Cu (II) que a su vez reflejan la fuerza y el alcance de la propiedad de encapsulación metálica de los nanotransportadores seleccionados. La encapsulación se analizó midiendo la variación calorífica durante la titulación del Cu (II) en soluciones nanotransportadoras utilizando un microcalorímetro MicroCal VP-ITC (MicroCal, LLC, Northampton, MA). En el caso de los CS NPs, la célula de muestra del microcalorímetro (1,4 ml) se llenó con 0,0035 mM de solución acuosa de los respectivos nanotransportadores. Se utilizó agua doblemente destilada a lo largo del experimento, a fin de evitar el efecto de otros iones disueltos. Tras el equilibrado de referencia, se inyectaron 0,78 mM de Cu (II) en 34 alícuotas x 8 µL utilizando la frecuencia de inyección predeterminada. En el caso de los sistemas CMS NP (por ejemplo, $_{10}\text{MS}_{\text{PEG6}}$ = MR 09), por otra parte, se tituló 1mM de solución de iones de Cu (II) en agua con 0,0014 mM de solución nanotransportadora. Se corrigió el calor de las curvas de titulación obtenidas para la disolución de iones de Cu(II) en agua, analizándose mediante el software Origin 7.0 ITC suministrado por MicroCal, LLC. El experimento ITC mide el cambio en la entalpía mediante la interacción del ligando y la macromolécula, y el calor liberado o absorbido es directamente proporcional a la unión entre la macromolécula y el ligando. En este experimento, las isotermas de adsorción que representan la interacción de los iones Cu (II) con los nanotransportadores son hiperbólicas y para todas las categorías de nanotransportadores se produce una rápida liberación inicial de calor en el lado negativo de la línea de base de la titulación, lo que indica una interacción exotérmica entre los iones Cu (II) y los nanotransportadores. El valor negativo del cambio aparente de entalpía (ΔH_{app}) indica el efecto predominante de la interacción-carga en el enlace. Al ajustarse a una serie de emplazamientos de enlace, el modo arrojó un valor de ΔH de -6812 Kcal/mol para un sistema CMS de 10 kDa, lo que indica que la encapsulación entre el ión metálico y el polímero es suficientemente fuerte. En función de la variación de la arquitectura molecular, el nivel de saturación de Cu (II) de los distintos nanotransportadores se alcanza a una proporción molar diferente en los respectivos sistemas. Las isotermas del Cu (II)-CMS NP se saturan de iones Cu (II) a una relación molar del nanotransportador de ~40: 1.

La técnica espectroscópica realizada en la banda de UV visible también reveló el proceso de encapsulación de las nanopartículas. Se mezcló una solución acuosa de los respectivos nanotransportadores (a diversas concentraciones calculadas con el valor numérico del peso molecular medio M_n) con una solución acuosa de Cu (II) para obtener una relación molar controlada [Cu (II) iones/nanotransportador] que oscile entre 0 y 100. Las soluciones se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente, con una agitación magnética uniforme para garantizar la máxima encapsulación. Se obtuvieron espectros de absorción en la banda UV-visible en un espectrofotómetro Scincro S-3100 utilizando células de cuarzo con una longitud de recorrido de 1 cm. En ausencia de nanopartículas con capacidades de formación de complejos, el Cu (II) existe primariamente como $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ en soluciones acuosas, lo que da lugar a una amplia y débil banda de absorción a 810 nm asociada con una transición d-d ($\epsilon \sim 10$). En presencia de un

sistema PEI hiper-ramificado, $\lambda_{\max}$ para la transición Cu (II) d-d se desplazó a 605 nm ($\epsilon \sim 30$). Además, apareció una fuerte transferencia de carga entre ligando y metal (LMCT) a 300 nm. Este cambio en el espectro UV-Vis permite seguir el enlace iónico del Cu (II) con las nanopartículas CS y CMS con átomos de nitrógeno secundarios y terciarios. En este experimento, la absorbancia $\lambda_{\max}$ a 605 nm aumentó a medida que aumentaba la proporción [Cu (II)]/[nanotransportador] hasta alcanzar un valor crítico, por encima del cual la absorbancia sólo aumentó lentamente. El cambio en las pendientes sugiere diferentes entornos para el catión Cu (II) antes y después de este valor crítico, y por tanto, para las interacciones entre los átomos de nitrógeno de los nanotransportadores y el catión metálico. La extrapolación de las dos regiones lineales de la absorbancia a esta longitud de onda permite evaluar la carga máxima de Cu (II) de las nano-partículas. Este experimento indica que tanto los sistemas CS como los CMS pueden encapsular hasta 45-50 iones Cu (II). La estequiometría de los enlaces encontrada mediante titulación espectroscópica UV-Vis comparte un elevado grado de correlación con los datos obtenidos mediante ITC.

-Cultivo de levadura

Se cultivaron células de *Pichia pastoris* durante la noche en 30 ml de un medio BMGY (1% (w/v) de extracto de levadura, 2% (w/v) de *bacto peptone*, 100 mM de fosfato potásico, pH 6,0, 1,34% (w/v) de base de nitrógeno de levadura, 4×10^{-5} % de biotina, 1% (w/v) de glicerol) a lo que siguió una inducción durante 48 h en 75 ml de medio BMMY [BMGY con un 2% (v/v) de metanol, en lugar de glicerol]. Para llevar a cabo la medición de la actividad SOD se recolectaron 2×10^8 células en la última fase exponencial de crecimiento y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min, se volvieron a suspender en 1 ml de H₂O, se lavaron una vez con 0,5M de EDTA, pH 8,0, y se suspendieron nuevamente en 1 ml de H₂O analizándose de nuevo mediante la prueba de la actividad SOD. En el caso de las medidas de ICP-MS se centrifugaron 15 ml de cultivo, como se ha descrito anteriormente. Para investigar el efecto de los nanotransportadores, el medio de inducción se ajustó a 10 μ M con excipiente o con excipiente más Cu(II)Cl₂, respectivamente.

-Lisis de células de levadura

Los pellets de las células lavadas se volvieron a suspender en una solución tampón de lisis de 100 μ l (50 mM de solución tampón de fosfato potásico, pH 7,4, 5% (v/v) de glicerol, 45mM de MgCl₂, 9×10^{-3} μ g/ μ l de ADNasa) más 5 μ l de solución completa (Roche) y un volumen equivalente de cuentas de cristal lavadas con ácido (0,5mm, Sigma) seguido de ocho ciclos de agitación durante 30 s, alternando con 30 s de enfriamiento en hielo.

-Cultivo celular

Se cultivaron células de CHO, SY5Y, HepG2 y HEK293 en estado natural, tal y como se describe en www.lgcpromochem-atcc.com. Para normalizar la carga del vehículo sobre las distintas líneas celulares, se determinó la tasa de crecimiento y se diseminaron cantidades adecuadas de células en placas de cultivo.

-Lisis celular

Se lavaron las células con 1x PBS obtenido por raspado de las placas de cultivo y se sometieron a lisis durante 30 min a 4 °C, en un dispositivo de rotación vertical en una solución tampón de lisis (50mM Tris/HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2% Triton X100, 2% NP40). La lisis se detuvo al cabo de 10 min de centrifugado a 10000rpm a 4 °C y el sobrenadante se recogió para futuros experimentos.

-Espectrometría de masas de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Los pellets de células lavadas se analizaron mediante ICP-MS. La ICP-MS se realizó utilizando un instrumento del sistema HP4500 Serie 300 ShieldTorch (Agilent, Waldbronn, Alemania) en modo de valores discretos seleccionados, con una separación de 0,05 unidades de masa atómica, con tres puntos por pico, tres barridos por réplica y un tiempo de integración de 300 ms por punto. La tasa de caudal de plasma fue de 15 litros/min con un caudal auxiliar de 0,9 litros/min y un caudal de mezcla de gas de 0,1 litros/min. La electricidad RF fue de 1,2 kW. La mezcla se introdujo utilizando un nebulizador de flujo cruzado con un caudal de 1,02 litros/min. El dispositivo se calibró utilizando una solución de HNO₃ al 6,5% que contenía Cu y Zn a razón de 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 400 partes por billón con Rh-103 como norma interna para todos los isótopos de Cu y Zn. Los datos obtenidos se normalizaron por la cantidad de células de levadura para comparar la cantidad intracelular determinada de iones metálicos por célula, midiéndose las muestras tres veces. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando tres mediciones independientes calculando el error estándar de la media (SEM). La importancia estadística se determinó mediante el test de Student.

-Ensayos SOD1

El ensayo de la actividad SOD se adquirió a Dojindo y se basa en la sal de tetrazolio, que es altamente soluble en agua, WST-1 (2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfopenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) que produce un pigmento formazán soluble en agua al reducirse con un anión superóxido. La tasa de reducción del anión superóxido guarda una relación lineal con la actividad de la Xantina oxidasa (XO), y es inhibida por el SOD. La absorbancia puede medirse a 450 nm. La preparación de la muestra para el ensayo de la actividad SOD (Dojindo) se realizó como se ha descrito anteriormente, pero con las muestras disueltas a 1:5. Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

-Ensayos MTT

Los ensayos MTT se adquirieron a Promega y se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Este ensayo se basa en la sal de tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 bromuro de difeniltetrazolio (MTT) que se introduce en las células y se reduce para obtener un producto de formazan púrpura muy impermeable a las membranas celulares, con lo que se consigue su acumulación en células sanas. Se diseminaron cantidades normalizadas de células pertenecientes a las diversas líneas celulares en placas de 96 pocillos, dejando que se asentasen durante 48 h y después se lavaron 3 veces con 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) seguido de un tratamiento con Optimem (Invitrogen) complementado con diversas concentraciones del vehículo y/o de cobre durante 5 h. Se transportaron mediante pipeta 20 µl del reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent en cada pocillo, que contenía 100 µl del medio de cultivo. Las placas se incubaron entre 1 y 4 h a 37 °C en una atmósfera humificada de CO₂ al 5%. La absorbencia se midió a 450 nm.

-Fraccionamiento celular

Se diseminaron 1,8*10⁶ SY5Y en platos de cultivo celular (10mm) dejando que reposasen durante 48 h, lavándose a continuación durante tres veces con 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) seguido de un tratamiento con Optimem (Invitrogen) complementado con diversas concentraciones del vehículo y/o de cobre durante 5 h. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron para llevar a cabo el análisis ICP-MS. Las células se lavaron una vez en 1x PBS y se rasparon de las placas. Se añadieron 2 ml de PBS-T para incubar las células durante 10 min a 4°C antes de su homogeneización. El fraccionamiento celular se llevó a cabo mediante una primera etapa de centrifugado durante 15 min a 500 x g obteniéndose P1. A eso le siguió un segundo centrifugado a 2600 x g durante 15 min, obteniéndose P2. El último centrifugado se efectuó a 100000 x g durante 30 min obteniéndose P3 y sobrenadante. P1, P2, P3 y los sobrenadantes se sometieron a ICP-MS para analizar el contenido de iones metálicos de los orgánulos.

-Preparación de los núcleos

Se diseminaron 1,8*10⁶ SY5Y en platos de cultivo celular (10mm) dejando que reposasen durante 48 h, lavándose a continuación durante tres veces con 1x PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) seguido de un tratamiento con Optimem (Invitrogen) complementado con diversas concentraciones del vehículo y/o de cobre durante 5 h. Las células lavadas 1 x PBS se trataron con 1 ml de solución tampón EZ de lisis del núcleo (Sigma) y se rasparon de los platos. El centrifugado a 500 x g aportó un sobrenadante que contenía componentes citoplásmicos. El pellet volvió a suspenderse in 700 µl de solución tampón EZ de lisis del núcleo (Sigma) y se agitó, seguido de incubación durante 5 min sobre hielo. El procedimiento de centrifugado se repitió, y la fracción de sobrenadante se congeló para su almacenamiento de cara a un análisis ICP-MS.

-Inmunofluorescencia

Se cultivaron células SY5Y en placas con tapa de cristal. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal LSM 510 meta (Carl Zeiss). El Cy3 se excitó a 543 nm y se detectó mediante un filtro de paso de 560-nm de longitud.

-Modelo in Vitro de la barrera hemato-encefálica

Se aislaron células endoteliales de rata y astrositos, cultivándose conjuntamente como se describe en Fitsanakis, J. Neurosci Res. 2005, 81(2) 235-243. En estos experimentos se cultivaron células en membranas de filtro. La formación de una monocapa de impacto se verificó mediante una medición de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER). La validación posterior del modelo se efectuó mediante medidas de la permeabilidad utilizando el Evans Blue y Sodio-Fluoresceína como marcadores del transporte paracelular y transcelular, respectivamente. Para verificar la capacidad de los nanotransportadores para penetrar la barrera hemato-encefálica se añadieron nanotransportes cargados con Cu y etiquetados con Cy3 a la cámara superior del sistema del modelo, incubándose durante 5 h a 37 °C. El contenido de las cámaras superior e inferior se retiró y analizó el contenido de Cu mediante ICP-MS, así como el contenido de vehículo, mediante espectrofotometría a 550 nm.

-Biodisponibilidad de la carga metálica para las enzimas intracelulares

La actividad total de las enzimas antioxidantes se midió utilizando un sistema comercialmente disponible en un kit (Cayman). Este ensayo está basado en la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS^R. Para simular el flujo sanguíneo a través del tejido ácido, el pH del medio pasó de 7,4 a 5,0 durante la incubación con el nanovehículo.

Ejemplo 2

El CU es encapsulado espontáneamente por las moléculas del vehículo

Se llegó a la conclusión de que el Cu es encapsulado espontáneamente por las moléculas del vehículo (NPs). Las soluciones acuosas del polímero se mezclaron con una solución acuosa de los iones metálicos (Cu(II)sulfato) para obtener una relación molar controlada [iones metálicos]:[polímero] de 40:1. Para investigar si las NPs se adhieren a las superficies celulares, se utilizaron nanopartículas etiquetadas de forma fluorescente. Tras el tratamiento de las células, la microscopía de barrido por láser (LSM) reveló la presencia de nanopartículas fijadas a la membrana de plasma de las células SY5Y (Figura 3).

Ejemplo 3

Absorción mediada por nanopartículas de Cu en células SY5Y

Treiber et al. (J. Biol. Chem. 279 (2004), 51858-64) demostraron que la sobreexpresión del APP humano reducía los niveles de Cu intracelular en células de levadura y desarrollaba actividades de descarga de Cu. Las células de levadura se transfectoraron con APP y se analizó el contenido de Cu mediante ICP-MS, un método muy sensible para la medición de los niveles de Cu. En función de este descubrimiento, en este experimento se analizaron los nanotransportadores en un sistema de cultivo celular para solventar la deficiencia de Cu indicada por el APP observada en las células. Los nanotransportadores descritos en el Ejemplo 1 añadidos al medio de cultivo de levadura incrementó drásticamente la concentración de Cu- intracelular. Podría demostrarse que tanto los CS NP como los CMS NP pueden transportar el cobre a las células (Figura 1). Esta actividad de transporte de cobre es 6 veces mejor en el CMS NP (barra blanca) en comparación con el CS NP (barra negra) (Figura 2). La saturación con cobre llevó a incrementos de entre 8 y 10 veces, respectivamente. Estos resultados se obtuvieron mediante el tratamiento de las células SY5Y con nanopartículas, seguido de una medición de células completas mediante ICP-MS.

En su conjunto, estos datos descubrieron una nueva función biológica de los nanotransportadores en la importación celular de iones Cu. Por último, los experimentos preliminares sugieren que las concentraciones efectivas de vehículos no son tóxicas para las células.

Ejemplo 4

Determinación del destino de la carga de Cu

Para determinar el destino de la carga de Cu, las células se fraccionaron mediante centrifugado diferencial. Se obtuvieron tres fracciones con compartimentos celulares enriquecidos: (a) núcleos y citosol; (b) mitocondria, lisosomas y peroxisomas; y (c) membrana de plasma, fragmentos ER, pequeñas vesículas y fracciones microsomales.

Para determinar cuánto Cu se ha transportado a los núcleos, los núcleos se aislaron utilizando un sistema en kit comercialmente disponible a través de Sigma Chemie (Deisenhofen, Alemania) y se determinó el contenido de Cu mediante ICP-MS. Los núcleos purificados sin un contaminante citosol y el posterior análisis ICP-MS identificaron el CS-Gly (KA-82) (Fig. 1b) como el nanotransportador que afecta específicamente al núcleo (Figura 4). La concentración de Cu- del núcleo aumentó 44 veces en comparación con las células tratadas con Cu libre. El contenido de Cu- fue 3 veces mayor en comparación con el vehículo cargado de Cu- MK77(CS-Glu), aunque ambos vehículos estaban basados en la gluconolactona. Los vehículos MR07 (_{3,6}MS_{PEG10}) y MR09 (₁₀MS_{PEG6}) (Fig. 1b) aumentaron los niveles de cobre del núcleo 4 o 7,5 veces, respectivamente.

Ejemplo 5

Las nanopartículas cargadas con Cu podrían atravesar la barrera hemato-cerebral in vivo

Para analizar la capacidad de las nanopartículas para atravesar la barrera hemato-cerebral se utilizó un modelo in Vitro de la barrera hemato-cerebral basado en células endoteliales primarias de ratas. Tras la incubación de las células con nanopartículas fluorescentes cargadas con Cu- se determinó el contenido de Cu- de (a) células enteras y (b) fracciones subcelulares, utilizando la espectrometría de masas de acoplamiento inductivo (para la detección del cobre) y la espectrofotometría (para la detección de las nanopartículas) (Figura 5).

Las células mostraron un transporte activo de Cu, así como las nanopartículas etiquetadas con fluorescencia (en torno al 17%; véase la Figura 6). Estos resultados indican que podía conseguirse el transporte atravesando la barrera hemato-cerebral en un animal vivo. Esta característica es esencial para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Ejemplo 6

Liberación de Cu procedente de nanopartículas en sistemas celulares mediante la reducción del valor del pH

Las nanopartículas de la presente invención están preferiblemente diseñadas de tal forma que la molécula de carga pueda liberarse reduciendo el valor del pH. Dado que los cerebros de los pacientes de AD presentan un valor de pH inferior en comparación con los cerebros de individuos sanos, las nanopartículas de la presente invención deberían resultar útiles para ajustar los desequilibrios de los iones metálicos. De este modo, se investigó si los iones metálicos transportados por las nanopartículas están a disposición de las enzimas celulares dependientes del Cu. La tensión oxidativa desencadenada por la reducción de Cu(II) a Cu(I) dentro de la célula, tan pronto como el cobre se encuentra presente en formato libre, facilita al menos una pista indirecta sobre la biodisponibilidad del cobre.

En el presente estudio se determinó la tensión oxidativa mediante el uso de kits disponibles comercialmente (Cayman). Se sabe que en los valores fisiológicos normales del pH no se libera el cobre de las nanopartículas. No obstante, en el presente estudio se observó la tensión oxidativa en las células que habían sido incubadas con nanopartículas cargadas con Cu- tras reducir el valor de pH a 6,0 (lo que corresponde al valor de pH encontrado en el tejido patológico) (Figura 7). Estos resultados indican que (a) al reducir el valor del pH se puede conseguir la liberación y convertibilidad del cobre transportado por las nanopartículas en sistemas celulares y (b) en un tejido moderadamente ácido de un animal vivo se libera cobre y se puede medir indirectamente.

REIVINDICACIONES

1. Nanovehículo con una estructura dendrítica, que está compuesto por un núcleo dendrítico y al menos un revestimiento para la encapsulación no covalente y/o el transporte de iones metálicos divalentes para su utilización en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con el transporte de iones metálicos divalentes.
2. Nanovehículo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nanovehículo tiene al menos dos revestimientos, y preferiblemente, el revestimiento exterior es hidrófilo y el revestimiento interior es no polar.
3. Nanovehículo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el núcleo dendrítico comprende poli (etileno imina) hiper-ramificado (PEI).
4. Nanovehículo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el núcleo puede funcionalizarse mediante elementos de construcción lineales anfifílicos formados por diácidos de alquilo conectados a monometil-ésteres del glicol de polietileno.
5. Nanovehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el revestimiento exterior comprende cadenas de monometil-ésteres de monometil del glicol de polietileno (mPEG).
6. Nanovehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el revestimiento interior comprende cadenas alifáticas largas, preferiblemente en las que la longitud de las cadenas alifáticas varía entre C_2 y C_{40} , variando preferiblemente entre C_{12} y C_{40} .
7. Nanovehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el promedio de peso molecular del nanovehículo varía entre 10.000 y 85.000 g/mol.
8. Nanovehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los iones metálicos divalentes son iones Cu- o iones Zn(II).
9. Nanovehículo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nanovehículo **se caracteriza porque** es capaz de liberar los iones metálicos divalentes encapsulados tras la reducción del valor del pH.
10. Composición farmacéutica que contiene un nanovehículo como el definido en la reivindicación 1 que transporta iones metálicos divalentes en un formato encapsulado no covalente para ser utilizado en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con el transporte de iones metálicos divalentes.
11. Nanovehículo como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que transporta iones de Cu en un formato encapsulado no covalente para ser utilizado en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con el transporte de iones de Cu.
12. Nanovehículo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el trastorno es la enfermedad de Alzheimer (AD) o la Enfermedad de Menkes.



Figura 1a

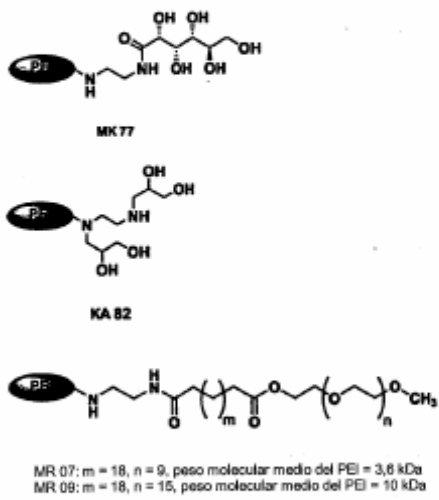


Figura 1b

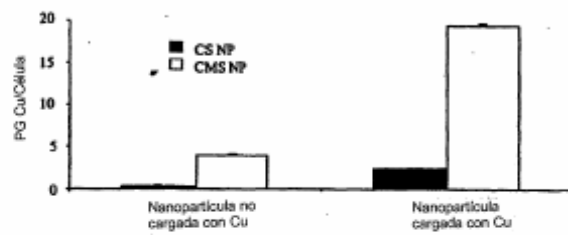
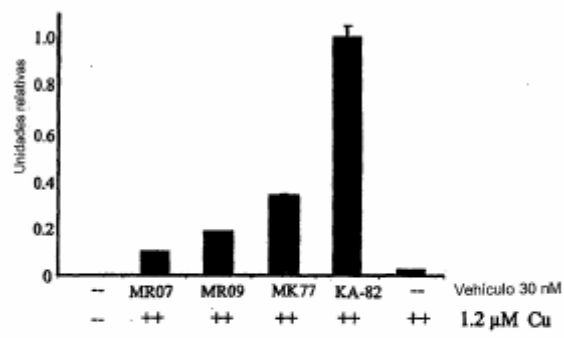
**Fig. 2:**



Figure 3

Fig. 4



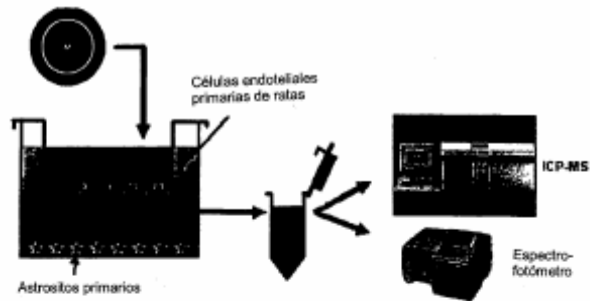


Figura 5

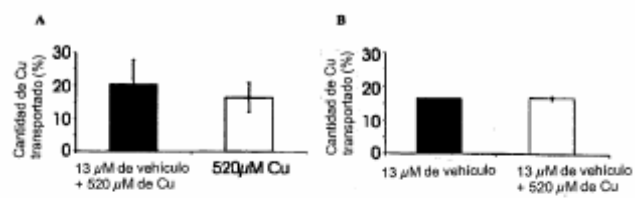


Figura 6

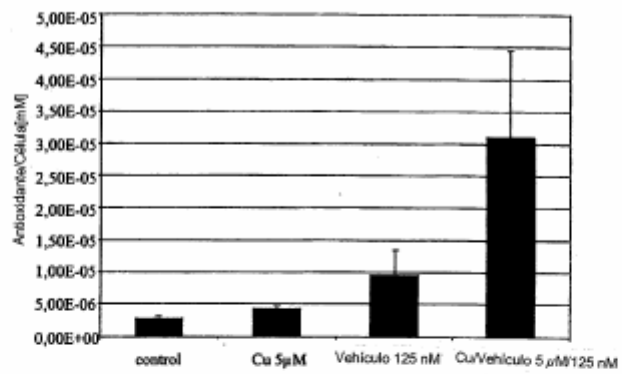


Figura 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

- WO 2006018295 A [0003] [0015]
- WO 2006115547 A2 [0004]
- EP 0928813 A1 [0005]
- EP 1278061 A1 [0006]
- WO 02077037 A [0014]
- WO 03037383 A [0014]
- US 20020187199 A [0014]

10

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- **Haag.** Angew. Chem., 2004, vol. 116, 280-4 [0003]
- **Haag.** Angew. Chem. Int. 2004, vol. 43, 278-82 [0003]
- **Krämer et al.** Macromolecules, 2005, vol. 38, 8308-15 [0003] [0029]
- **Radowski et al.** Angew. Chem, 2007, vol. 119, 1287-1292 [0003]
- **Aller ; Unger.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, vol. 103, 3627-32 [0011]
- **Haag.** Angew. Chem., 2007, vol. 119, 1287-1292 [0014]
- **Haag.** Angew. Chem., 2002, vol. 114, 4426-31 [0014]
- **Radowski et al.** Angew. Chem, 2007, 1287-92 [0029]
- **Fitsanakis.** J. Neurosci Res., 2005, vol. 81 (2), 235-243 [0041]
- **Treiber et al.** J. Biol. Chem., 2004, vol. 279, 51858-64 [0044]