



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 506**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 31/451 (2006.01)

A61K 31/4741 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02738009 .6**

96 Fecha de presentación : **30.04.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1392255**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Nanopartículas de proteína con apolipoproteína E acoplada para la superación de la barrera hematocefálica y procedimiento para su fabricación.**

30 Prioridad: **05.05.2001 DE 101 21 982**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

73 Titular/es: **LTS Lohmann Therapie-Systeme AG.**
Lohmannstrasse 2
56626 Andernach, DE

72 Inventor/es: **Kreuter, Jörg;**
Langer, Klaus;
Weber, Carolin y
Alyautdin, Renad, N.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 365 506 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

Nanopartículas de proteína con apolipoproteína E acoplada para la superación de la barrera hematocefálica y procedimiento para su fabricación

5 La presente invención se refiere a nanopartículas a partir de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas, con preferencia a partir de seroalbúmina, en particular de origen humano, que pueden superar la barrera hematocefálica por medio de apolipoproteína E ligada, para transportar sustancias farmacéutica o biológicamente activas al líquido cerebroespinal.

10 Las nanopartículas son partículas con un tamaño entre 10 y 1000 nm, que se pueden fabricar a partir de sustancias macromoleculares sintética so naturales. En nanopartículas de este tipo se pueden ligar medicamentos u otro material biológicamente activo, de forma covalente, iónica o por adsorción o se pueden incorporar en el material de las nanopartículas.

15 No obstante, hasta ahora solamente las nanopartículas de polialquilcianoacrilatos, que habían sido revestidas con polisorbato 80 (Tween® 80) u otros tensidos, estaban en condiciones de superar la barrera hematocefálica, para transportar medicamentos hidrófilos al líquido cerebroespinal y provocar efectos farmacológicos. El mecanismo de este transporte se basa, según las investigaciones hasta ahora, en que apolipoproteína E (ApoE) es adsorbida por las nanopartículas a través del revestimiento de polisorbato 80. De esta manera, estas partículas simulan presumiblemente partículas de lipoproteína, que son reconocidas y ligadas por los receptores-LDL de las células endoteliales capilares cerebrales, las cuales garantizan el suministro de lípidos.

20 Una serie de medicamentos han podido transportarse por medio de nanopartículas de polibutilcianoacrilato revestidas con polisorbato 80 y otros tensidos a través de la barrera hematocefálica y provocar un efecto farmacológico significativo. Ejemplos de tales medicamentos administrados de esta manera son dalargina, un hexapéptido de endorfina, loperamida y tubocuarina, que son ambos antagonistas del receptor de NMDA MRZ 2/576 o bien MRZ 2/596 de la Fa. Merz, Frankfurt, así como el agente anticancerígeno doxorubicina.

25 Los inconvenientes de las nanopartículas de polibutilcianacrilato residen, sin embargo, en que el polisorbato 80 no es fisiológico y en que el transporte sobre la barrera hematocefálica podría basarse posiblemente en un efecto tóxico del polisorbato 80. Un revestimiento de nanopartículas de polibutilcianacrilato con polisorbato 80 u otros tensidos no es, sin embargo, esencial para el transporte de las nanopartículas de polibutilcianacrilato sobre la barrera hematocefálica. No obstante, las nanopartículas de polibutilcianacrilato conocidas tienen el inconveniente adicional de que tanto la ligazón de la ApoE como también de los medicamentos solamente se realiza por adsorción. De esta manera, la ApoE ligada en las nanopartículas o bien el medicamento está presente en equilibrio con ApoE o medicamento libre, y después de la inyección en el organismo puede realizar una desorción rápida de estas sustancias desde las partículas. Además, la mayoría de los medicamentos no se ligan en una medida suficiente a nanopartículas de polibutilcianacrilato y, por lo tanto, no se pueden transportar con la ayuda de este sistema portador sobre la barrera hematocefálica.

35 La presente invención tenía el cometido de preparar nanopartículas para la superación de la barrera hematocefálica, que no tienen los inconvenientes mencionados anteriormente y que, evitando tensidos no fisiológicos, no han adsorbido solamente la apolipoproteína E necesaria para el transporte sobre la barrera hematocefálica.

40 El cometido se ha solucionado de manera sorprendente a través de nanopartículas, que están constituidas por una proteína hidrófila o por una combinación de proteínas hidrófilas, con preferencia por seroalbúmina, de manera especialmente preferida por seroalbúmina humana, o por una proteína comparable, en las que está acoplada apolipoproteína E de forma covalente o a través del sistema avidina / biotina.

45 En la albúmina se trata de un grupo de proteínas que existen sobre todo en líquidos animales / humanos, por ejemplo la seroalbúmina en la sangre, o en tejidos. Las albúminas son ricas en aminoácidos cargados negativamente así como en leucina o isoleucina. En comparación con las globulinas concomitantes, las albúminas poseen masas moleculares más bajas y solamente se pueden rellenar por medio de concentraciones salinas relativamente altas.

También la gelatina A, gelatina B, caseína o proteínas comparables son adecuadas como proteínas de partida para las nanopartículas de acuerdo con la invención.

50 La apolipoproteína E es un componente de los complejos de lipoproteína. Estos complejos de lípidos y apolipoproteínas posibilitan el transporte de los lípidos insolubles en agua en la sangre. La ApoE intermedia presumiblemente en el transporte de las nanopartículas de acuerdo con la invención sobre la barrera hematocefálica, ligándose en os receptores de LDL de las células endoteliales capilares cerebrales.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden presentar adicionalmente una o varias proteínas funcionales, que están ligadas a través de moléculas espaciadoras funcionales a grupos tiol de las nanopartículas

modificadas con grupos tiol. Para la preparación de tales nanopartículas, se pueden hacer reaccionar los grupos funcionales, que se encuentran sobre la superficie de las nanopartículas, (grupos amino, grupos carboxilo, grupos hidroxilo) a través de reactivos adecuados para obtener grupos tiol reactivos. Las proteínas funcionales se pueden ligar entonces a través de moléculas espaciadoras bifuncionales, que presentan una reactividad tanto frente a

5

grupos amino como también frente a grupos tiol libres, a las nanopartículas modificadas con grupos tiol.

Las proteínas funcionales a acoplar de esta manera a las nanopartículas se pueden seleccionar del grupo, que comprende avidina, derivados de avidina, apolipoproteínas, como por ejemplo apolipoproteína E, pero también anticuerpos, enzimas y similares. En este caso, las proteínas funcionales propiamente dichas tienen un efecto farmacológico o biológico.

10 En una forma de realización preferida, las nanopartículas de acuerdo con la invención presentan avidina acoplada covalente, a través de la cual se puede ligar apolipoproteína E biotinilada, como se representa de forma ilustrativa en la figura 1. La propia avidina es una glicoproteína altamente afin a biotina, que se puede ligar a través de las moléculas espaciadoras bifuncionales mencionadas anteriormente covalentemente a los grupos tiol de las nanopartículas tiolizadas. A través de la ligazón covalente de la avidina a las nanopartículas no sólo se puede ligar

15 ApoE biotinilada, que es necesaria para el transporte sobre la barrera hematocefálica, sino que se pueden ligar una pluralidad de moléculas biotiniladas de una manera especialmente eficiente por las nanopartículas modificadas con avidina. En este caso se prefieren especialmente moléculas activas farmacológica o biológicamente.

Para transmitir efectos farmacológicos, las nanopartículas de acuerdo con la invención pueden presentar sustancias farmacológica o biológicamente activas. Estas sustancias activas pueden estar incorporadas en las nanopartículas o son ligadas por las nanopartículas. En este caso, la ligazón de las sustancias farmacológica o biológicamente activas se puede realizar tanto de forma covalente, complexante a través del sistema avidina-biotina como también por incorporación o adsorción.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención son especialmente bien adecuadas para ligar medicamentos, que no presentan ningún paso o un paso insuficiente sobre la barrera hematocefálica, como por ejemplo dalargina, loperamida, tubocuarina o doxorubicina o similar y para transportarlos sobre la barrera hematocefálica y para provocar efectos farmacológicos.

El procedimiento para la fabricación de las nanopartículas de acuerdo con la invención a partir de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas para la superación de la barrera hematocefálica comprende las siguientes etapas:

- 30
- desolvatación de una solución acuosa de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas,
 - estabilización de las nanopartículas resultantes a través de la desolvatación por medio de reticulación cruzada,
 - conversión de una parte de los grupos funcionales sobre la superficie de las nanopartículas estabilizadas en grupos tiol reactivos,
- 35
- fijación covalente de proteínas funcionales por medio de moléculas espaciadoras bifuncionales,
 - biotinilación de apolipoproteínas E, si las partículas no presentan apolipoproteína E acoplada covalente,
 - carga de las nanopartículas modificadas con avidina con ApoE biotinilada y con la sustancia activa farmacológica a administrar.

40 Para la fabricación de las nanopartículas se utiliza una proteína hidrófila o una combinación de proteínas hidrófilas como material de partida. Con preferencia, se desolvata una solución acuosa de seroalbúmina, de manera especialmente preferida de seroalbúmina humana, bajo agitación. Las nanopartículas resultantes son estabilizadas a través de reticulación cruzada y los grupos funcionales (grupos amino, grupos carboxilo, grupos hidroxilo) sobre la superficie de las nanopartículas son convertidos a través de reactivos adecuados en grupos tiol reactivos.

45 La desolvatación a partir del disolvente acuoso se realiza con preferencia a través de la adición de etanol. En principio, también es posible una desolvatación a través de la adición de otros no disolventes miscibles con agua para proteínas hidrófilas como acetona, isopropanol o metanol. Así, por ejemplo, fue desolvatada gelatina como proteína de partida con éxito a través de la adición de acetona. De la misma manera es posible una desolvatación de proteínas disueltas en fase acuosa a través de la adición de sales formadoras de estructura como sulfato de magnesio o sulfato de amonio. En este caso, se habla de salificación.

50

Como reticulantes cruzados para la estabilización de las nanopartículas se contemplan aldehídos bifuncionales, con preferencia glutaraldehído, así como formaldehído. Además, es posible una reticulación cruzada de la matriz de nanopartículas a través de procesos térmicos. Se obtuvieron sistemas de nanopartículas estables a 60 °C durante

periodos de tiempo de más de 25 horas o a 70 °C durante periodos de tiempo de más de 2 horas.

La tiolización de la superficie de las nanopartículas se puede realizar de acuerdo con diferentes principios. Con preferencia, se hacen reaccionar los grupos amino sobre la superficie de las partículas con 2-iminotiolano, que reacciona con grupos amino primarios sobre la superficie de las partículas, para obtener grupos tiol libres sobre la superficie de las partículas. Además, se pueden obtener grupos tiol también a través de disociación de los enlaces de disulfuro presentes en la superficie de la matriz de nanopartículas con ditiotreitolo (DTT). De manera alternativa, se pueden hacer reaccionar grupos carboxilo libres de la superficie de las partículas con 1-etil-4-(3-dimetilamino propil)carbodiimida (EDC) / cisteína o con EDC / dicloruro de cistaminio y los enlaces de disulfuro introducidos de esta manera se pueden disociar a continuación con DTT por reducción.

Se pueden acoplar proteínas funcionales a través de moléculas espaciadoras bifuncionales, que presentan una reactividad tanto frente a grupos amino como también frente a grupos tiol libres, a las nanopartículas modificadas con grupos tiol. Son aplicables moléculas espaciadoras heterobifuncionales con reactividades frente a grupos carboxilo o grupos hidroxilo, pero también moléculas espaciadoras homobifuncionales con reactividades frente a grupos amino. Una sustancia preferida, que puede asumir la función de una molécula espaciadora bifuncional, es éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS). Además de éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida se emplearon con éxito también otras moléculas espaciadoras heterobifuncionales como sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]-ciclohexan-1-carboxilato (sulfo-SMCC) o sulfosuccinimidil-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-etil-1,3'-ditiopropionato (SAND) así como las moléculas espaciadoras homobifuncionales dimetil-3,3'-ditiobispropionimidat-diclorhidrato (DTBP) o 3,3'-ditiobis[sulfo-succinimidilpropionato] (DTSSP). No obstante, se prefieren moléculas espaciadoras heterobifuncionales, puesto que las moléculas espaciadoras homobifuncionales conducen como reacción secundaria a la ligazón de una proteína funcional a la superficie de las nanopartículas, también a una posible reticulación cruzada intramolecular.

En un procedimiento especialmente preferido, se acopla avidina o un derivado de avidina por medio de las moléculas espaciadoras bifuncionales a las nanopartículas tiolizadas. Este producto intermedio, nanopartículas modificadas con avidina, representa un sistema portador universal para una pluralidad de sustancias biotiniladas, que pueden ser ligadas a través de la formación del complejo de avidina-biotina.

Para la ligazón de la apolipoproteína E humana a las nanopartículas modificadas con avidina se puede biotinar la apolipoproteína E a través de reacción con N-hidroxisuccinimidobiotina (NHS-biotina). De la misma manera se pueden aplicar otros reactivos de biotinilación, que reaccionan con grupos amino u otros grupos funcionales de la proteína a ligar. Como otros grupos funcionales de la proteína a ligar se contemplan para la biotinilación también grupos sulfhidrilo o grupos carboxilo libres. Los reactivos de biotinilación alternativos para grupos amino se diferencian de la NHS-biotina en la funcionalidad amino-reactiva, porque tienen, por ejemplo, grupos pentafluorofenilo en lugar de grupos succinimido, o en el intervalo entre biotina y la funcionalidad amino-reactiva.

Para transmitir efectos farmacológicos, se incorporan sustancias farmacéutica o biológicamente activas en las partículas o se ligan directa o bien indirectamente en las nanopartículas modificadas con avidina. Las nanopartículas modificadas con avidina se pueden cargar al mismo tiempo con apolipoproteína E biotinilada y con una sustancia activa farmacéutica. En este caso, la ligación de la sustancia activa se puede realizar tanto de forma covalente, complexante a través del sistema avidina-biotina como también por adsorción.

Las nanopartículas de acuerdo con la invención a partir de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas, que han ligado apolipoproteína E, son adecuadas para transportar sustancias farmacéutica o biológicamente activas, que en otro caso no pasarían la barrera hematocefálica, en particular sustancias activas hidrófilas, sobre la barrera hematocefálica. Ejemplos de sustancias activas de este tipo son dalarpina, loperamida, tubocuarina, doxorubicina o similares.

Las nanopartículas cargadas con sustancia activa descritas son adecuadas para el tratamiento de una pluralidad de enfermedades cerebrales. En este caso, las sustancias activas ligadas al sistema portador se seleccionan de acuerdo con el objeto respectivo de la terapia. El sistema portador se ofrece sobre todo para las sustancias activas, que no presentan ningún paso o un paso insuficiente sobre la barrera hematocefálica. Como sustancias activas se contemplan citoestáticos para la terapia de tumores cerebrales, sustancias activas para la terapia de infecciones víricas en la zona cerebral, por ejemplo infecciones HIV, pero también sustancias activas para la terapia de enfermedades de demencia, por citar solamente algunos campos de aplicación.

La figura 1 muestra una forma de realización preferida de las nanopartículas de acuerdo con la invención sin sustancia activa u otra proteína funcional.

A continuación se ilustra la invención con la ayuda de una forma de realización ejemplar, en la que esta representación debe comprender sin limitación de ninguna clase el sentido y la esencia de la invención.

Para la preparación de nanopartículas a partir de seroalbúmina humana (HSA), se disolvieron 200 mg de seroalbúmina humana en 2,0 ml de agua purificada. A esta solución se añadieron por goteo con agitación con un

agitador magnético (500 rpm) 0,8 ml al 96 % en volumen de etanol.

5 Las nanopartículas generadas fueron estabilizadas, añadiendo al matraz de reacción 235 µl de una solución acuosa de glutaraldehído al 8 % (m/v) y agitándolas en el transcurso de 24 horas a temperatura ambiente. Las nanopartículas estabilizadas fueron purificadas a través de centrifugación cinco veces (16.000 rcf, 8 min.) y redispersión en 1,5 ml de agua purificada. A través de determinación gravimétrica se estableció el contenido resultante de nanopartículas en la suspensión.

10 A continuación se mezclaron 2,0 ml de la suspensión de nanopartículas con 2,0 ml de una solución de 13 mg de 2-iminotiolano (reactivo de Traut) en tampón Tris (pH 8,5) y se agitaron en el transcurso de 24 horas, para tiolizar la superficie de las partículas. Las nanopartículas fueron purificadas después de la tiolización como se ha descrito anteriormente.

15 El derivado de avidina NeutrAvidin™ fue ligado a través de éster de m-maleimido-benzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), una sustancia que funciona como sustancia espaciadora bifuncional, de forma covalente a las nanopartículas tiolizadas. Con esta finalidad, se activó el derivado de avidina, mezclando una solución de 5,0 mg de NeutrAvidin™ en 1,0 ml de tampón PBS (pH 7,0) con 1,6 mg de sulfo-MBS y se agitó en el transcurso de 1 hora a temperatura ambiente. El sulfo-MBS fue separado de la NeutrAvidin activada a través de una cromatografía de exclusión de tamaño.

20 Las fracciones, en las que se pudo verificar NeutrAvidin a una longitud de onda de 280 nm, fueron reunidas y mezcladas con 2,0 ml de las nanopartículas tiolizadas y se agitaron en el transcurso de 1 hora a temperatura ambiente. Las nanopartículas de HSA modificadas con avidina fueron purificadas como se ha descrito anteriormente.

25 Se biotiniló apolipoproteína E (ApoE) disolviendo 250 µg de ApoE en 125 µl de tampón PBS isotono, pH 7,4 y mezclando esta solución con una solución de 150 µg de biotina NHS (N-hidroxisuccinimidobiotina) en 15 µl de DMSO. Después de un tiempo de reacción de 2 horas a 10 °C con agitación se diluyó esta mezcla con otros 300 µl de tampón PBS, pH 7,4. La biotina NHS todavía libre se fue separada de la ApoE biotinilada a través de una cromatografía de exclusión de tamaños. Las fracciones, en las que era verificable ApoE a través de detección fotométrica a una longitud de onda de 280 nm, fueron purificadas y liofilizadas.

30 Las nanopartículas de HSA modificadas con avidina fueron cargadas inmediatamente antes del ensayo en animales con la ApoE biotinilada y la sustancia activa dalargina. A tal fin, se disolvió la ApoE liofilizada en 250 µl de agua destilada y se mezcló con 280 µl de una suspensión de nanopartículas de HSA, que contenía 4,9 mg de nanopartículas de HSA modificada con avidina. Se añadió una solución de 1,125 mg de dalargina en 470 µl de agua y la mezcla se incubó en el transcurso de 3 horas a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se diluyó la mezcla a través de la adición de 500 µl de tampón PBS isotono, pH 7,4.

35 Una cuantificación de la carga de las nanopartículas de HSA modificadas con avidina con dalargina dio como resultado que con una relación de dalargina / nanopartículas = 191 µg/mg se realizó una ligazón por adsorción de 23,7 µg/mg (= 12,4 %) de dalargina.

La preparación lista para la aplicación contenía en un volumen total de 1,5 ml de tampón de PBS isotono:

- 3,93 mg/ml de nanopartículas de HSA modificadas con avidina,
- 167 µg/ml de ApoE (ligada a las nanopartículas a través del sistema avidina-biotina),
- 0,75 mg/ml de dalargina (de ellos 12,4 % ligados por adsorción a nanopartículas).

40 La preparación fue aplicada a ratones i. v. en una dosificación de 7,5 mg/kg de dalargina. Esto corresponde, partiendo de un peso corporal medio de un ratón de 20 g, a una cantidad de aplicación de 200 µl de la preparación indicada anteriormente por ratón.

45 El efecto analgésico (Respuesta Nociceptiva) se determinó con la ayuda del Test de Tail-Flick, en el que se proyecta un rayo de luz caliente sobre la cola del ratón y se mide el tiempo hasta que el ratón retira la cola. Después de 10 segundos (= 100 % MPE) se interrumpió el experimento, para no añadir ningún daño al ratón. El efecto analgésico máximo posible (MPE = efecto máximo posible) se determinó según la fórmula siguiente:

$$\text{Tiempo de reacción después de la aplicación} - \text{tiempo de reacción antes de la aplicación}$$

% MPE _____ X 100

$$\text{Tiempo de interrupción} - \text{tiempo de reacción antes de la aplicación}$$

Resultan valores MPE negativos cuando el ratón retira su cola después de la administración de la preparación más pronto que antes del tratamiento.

Con la ayuda de nanopartículas de HSA modificadas con avidina, cargadas con dalargina se consiguieron después de inyección intravenosa los efectos analgésicos representados en la Tabla 1.

5

Tabla 1

Efecto analgésico [% MPE] en ratones (n = 6) después de aplicación i. v. de dalargina (7,5 mg/kg) en forma de una de las preparaciones indicadas. (MPE = Efecto Máximo Posible).

Preparación	30 min.	45 min.	90 min.	120 min
10 Nanopartículas de avidina HSA + ApoE + dalargina	25,1 ± 12,4	49,0 ± 23,7	2,1 ± 19,6	-0,23 ± 12,3
15 Controles *				
20 Nanopartículas de Avidina HSA + dalargina	-2,6 ± 3,9	-5,4 ± 10,9	-14,4 ± 17,4	-9,6 ± 20,6
25 Nanopartículas de PBCA + dalargina + polisorbato 80	35,2 ± 5,8	49,5 ± 4,5	36,5 ± 13,7	7,1 ± 6,3
25 Solución de dalargina	10,0 ± 9,8	9,3 ± 2,8	4,7 ± 5,1	2,0 ± 6,1

30 * Los datos comparativos de nanopartículas de PBCA + dalargina + polisorbato 80 y solución de dalargina proceden de un experimento anterior.

Los resultados muestran que los efectos analgésicos conseguidos con las nanopartículas de HSA modificadas con avidina corresponden a los efectos, que se pueden conseguir con las nanopartículas de polibutilciano-acrilato (nanopartículas de PBCA).

35

REIVINDICACIONES

- 1.- Nanopartículas para la superación de la barrera hematocefálica, caracterizadas porque están constituidas por una proteína hidrófila o una combinación de proteínas hidrófilas, a las que está acoplada o ligada apolipoproteína E.
- 5 2.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizadas porque la al menos una proteína hidrófila está seleccionado del grupo que comprende seroalbúmina, gelatina A, gelatina B, caseína y proteínas comparables, o una combinación de estas proteínas.
- 3.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, caracterizadas porque al menos una proteína hidrófila es de origen humano.
- 10 4.- Nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque presentan una o varias proteínas funcionales diferentes, que están ligadas a través de moléculas espaciadoras bifuncionales a grupos tiol de nanopartículas modificadas con grupos tiol.
- 5.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizadas porque las proteínas funcionales están seleccionadas del grupo que comprende avidina, derivados de avidina, apolipoproteínas, anticuerpos, enzimas, hormonas, citoestáticos.
- 15 6.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizadas porque apolipoproteína E biotinilada está ligada a través de avidina acoplada covalente.
- 7.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizadas porque al menos otra proteína funcional biotinilada está ligada a través de avidina acoplada covalente.
- 20 8.- Nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizadas porque tienen incorporadas o ligadas sustancias farmacológica o biológicamente activas.
- 9.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizadas porque las sustancias farmacológica o biológicamente activas están ligadas sobre la superficie de las partículas.
- 10.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizadas porque las sustancias farmacológica o biológicamente activas están ligadas de forma covalente, complejante a través del sistema avidina-biotina o por adsorción.
- 25 11.- Nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizadas porque las sustancias activas están seleccionadas del grupo que comprende dalargina, loperamida, tubocuarina y doxorubicina.
- 12.- Procedimiento para la fabricación de las nanopartículas a partir de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas para la superación de la barrera hematocefálica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 30
- desolvatación de una solución acuosa de una proteína hidrófila o de una combinación de proteínas hidrófilas,
 - estabilización de las nanopartículas resultantes a través de la desolvatación por medio de reticulación cruzada,
 - 35 - conversión de una parte de los grupos funcionales sobre la superficie de las nanopartículas estabilizadas en grupos tiol reactivos,
 - fijación covalente de proteínas funcionales por medio de moléculas espaciadoras bifuncionales,
 - biotinilación de apolipoproteínas E,
 - carga de las nanopartículas modificadas con avidina con apolipoproteína E biotinilada,
 - 40 - carga de las nanopartículas modificadas con avidina con apolipoproteína E biotinilada y otras proteínas funcionales o sustancias farmacéutica o biológicamente activas.
- 13.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la proteína hidrófila está seleccionada del grupo, que comprende seroalbúmina, gelatina A, gelatina B, caseína y proteínas comparables, o una combinación de estas proteínas.
- 45 14.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13, caracterizado porque la proteína hidrófila es de origen humano.

- 15.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado porque la desolvatación se realiza a través de agitación y adición de un no disolvente miscible con agua para proteínas hidrófilas o a través de salificación.
- 5 16.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el no disolvente miscible con agua para proteínas hidrófilas se selecciona del grupo que comprende etanol, metanol, isopropanol y acetona.
- 17.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 16, caracterizado porque para la estabilización de las nanopartículas se utilizan procesos térmicos o aldehídos bifuncionales o formaldehído.
- 18.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque como aldehído bifuncional se utiliza glutaraldehído.
- 10 19.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 18, caracterizado porque como agente modificador de grupos tiol se utiliza una sustancia, que se selecciona del grupo que comprende 2-iminotiolano, una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y cisteína o una combinación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y dicloruro de cistaminio así como ditiotreitól.
- 15 20.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 19, caracterizado porque como molécula espaciadora bifuncional se utiliza una sustancia, que está seleccionada del grupo, que comprende éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfo-succinimida, sulfosuccinimidil-4-[N-maleimido-metil]ciclohexan-1-carboxilato, sulfosuccinimidil-2-[m-azido-o-nitrobenzamido]-etil-1,3'-ditiopropionato, dimetil-3,3'-ditiobispropionimidat-diclorhidrato y 3,3'.ditiobis[sulfosuccinimidilpropionato].
- 20 21.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 20, caracterizado porque las sustancias activas están seleccionadas del grupo que comprende dalargina, loperamida, tubocuarina y doxorubicina.
- 22.- Nanopartículas, que comprende una proteína hidrófila o una combinación de proteínas hidrófilas, que tienen ligada apolipoproteína E, para la utilización para el transporte de sustancias farmacéutica o biológicamente activas sobre la barrera hematocefálica.
- 25 23.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 22, caracterizadas porque al menos una de las proteínas hidrófilas está seleccionada del grupo que comprende seroalbúmina, gelatina A, gelatina B, caseína y proteínas comparables, o una combinación de estas proteínas.
- 24.- Nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 22 ó 23, caracterizadas porque al menos una de las proteínas hidrófilas es de origen humano.
- 30 25.- Nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizadas porque las sustancias activas están seleccionadas del grupo que comprende dalargina, loperamida, tubocuarina y doxorubicina.
- 26.- Nanopartículas de acuerdo con una de las reivindicaciones 22 a 25 para la utilización en el tratamiento de enfermedades cerebrales.

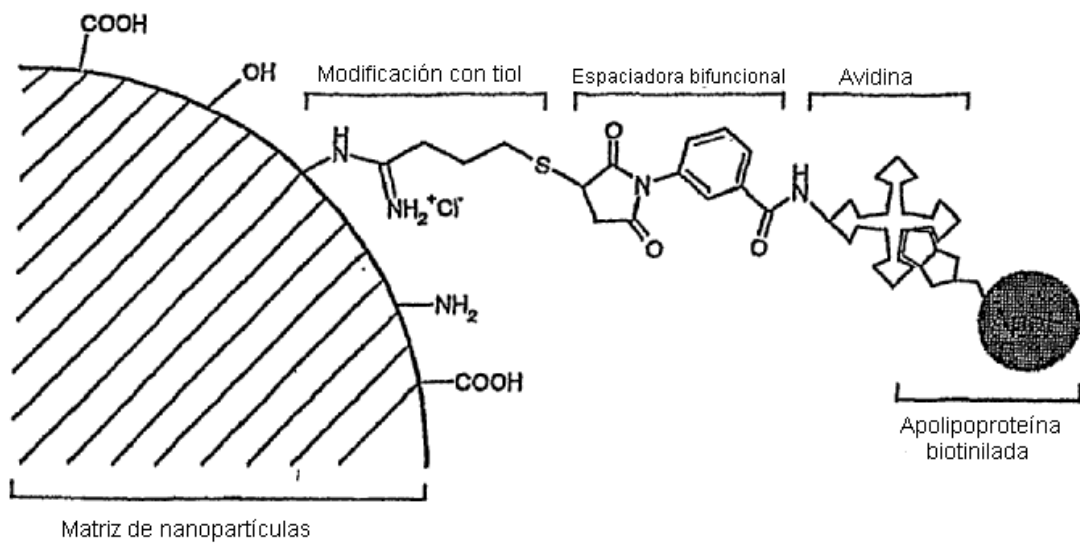


FIG. 1