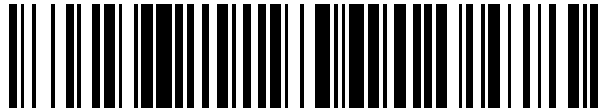


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 791**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2010 E 10745197 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2464969**

54 Título: **Métodos de exploración de nanopartículas empleando insectos con barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

12.08.2009 US 233154 P

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

28.03.2014

73 Titular/es:

**ENTOMOPHARM APS (100.0%)
Lundekaersvej 33
5250 Odense SV, DK**

72 Inventor/es:

**AADAL NIELSEN, PETER;
ANDERSSON, GUNNAR y
ANDERSSON, OLGA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 451 791 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

Métodos de exploración de nanopartículas empleando insectos con barrera hematoencefálica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a modelos de insectos enfocados a reflejar la penetración de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica (BHE) de vertebrados. La investigación de la penetración de nanopartículas a través de la barrera hematoencefálica (BHE) es extremadamente importante dado que cada vez hay un mayor uso de las nanopartículas y el perfil de muchas de estas es aún desconocido. Además, las nanopartículas son importantes en el descubrimiento de fármacos al haberse comprobado que son útiles como posibles vehículos de fármacos que ejercen su efecto en el SNC. Por un lado los fármacos que ejercen su efecto de un modo satisfactorio en el SNC tienen que atravesar la BHE. Por otro lado la penetración de las nanopartículas a través de la BHE también puede producir efectos secundarios no deseados. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de insectos para explorar la penetración de nanopartículas a través de la BHE.

Antecedentes de la invención

Aunque hay datos anecdóticos que indican una relación causal entre la exposición prolongada de partículas ultrafinas en el ambiente (por ejemplo, relacionadas con el tráfico) o en el entorno laboral (por ejemplo, emisión de gases metálicos) y los efectos neurotóxicos resultantes en seres humanos, se requieren más estudios para analizar la hipótesis de que las nanopartículas (NP) inhaladas o las NP absorbidas a través de los alimentos producen efectos neurodegenerativos. Algunas NP pueden tener una posible toxicidad (peligro) significativa, y esto planteará un riesgo significativo si hay bastante exposición. La cuestión es identificar dichas NP peligrosas y tomar las medidas apropiadas para prevenir la exposición.

Además, en cuanto a la lucha contra trastornos cerebrales del SNC, las NP han mostrado ser prometedoras como vehículos de fármacos que, de otro modo, no hubieran podido atravesar la barrera hematoencefálica. El cerebro es exclusivamente particular en comparación con otros órganos del cuerpo. A pesar de los enormes avances realizados en investigación sobre el cerebro, los trastornos cerebrales del SNC continúan siendo responsables de una gran cantidad de hospitalizaciones que requieren cuidado prolongado. Se calcula que aproximadamente 1,5 billones de personas en todo el mundo padecen diversos trastornos del SNC, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral, esclerosis múltiple, demencia debida al VIH e ictus, entre otras. En los últimos años, la explosión de interés en los aspectos biológicos de los trastornos del SNC así como el cerebro ha conducido a una mejora en el entendimiento y el tratamiento de estos trastornos; sin embargo, para muchos pacientes, aún continua habiendo trastornos crónicos y debilitantes. Dado que la transición demográfica muestra un aumento en el porcentaje de personas de edad avanzada en la población, las enfermedades cerebrales se están convirtiendo en un problema de salud principal. Para el 2020, se espera que el número de casos de enfermedades del SNC sea de aproximadamente 1,9 billones. A pesar de estas cuestiones, la identificación de fármacos que ejercen su acción en el cerebro desempeña un papel vital y proporciona una gran esperanza para el tratamiento de estos trastornos.

La barrera hematoencefálica (BHE) ha presentado siempre un reto a los científicos para la identificación de fármacos que ejercen su acción en el cerebro. La BHE ha evolucionado de tal manera que protege al cerebro de diversas sustancias extrañas tales como neurotoxinas. Este mecanismo hace que la BHE sea una barrera infranqueable para numerosos fármacos muy esenciales, incluyendo antibióticos, citostáticos y otros fármacos activos en el SNC.

Se han desarrollado muchas estrategias que superan las dificultades ocasionadas por la BHE. Estas incluyen estrategias tanto invasivas como no invasivas. Las estrategias invasivas incluyen la alteración temporal de la BHE que permite la entrada de fármacos al cerebro y dirigen la administración del fármaco al cerebro mediante inyecciones intraventriculares o intracerebrales e implantes poliméricos intracerebrales. Las estrategias no invasivas utilizan vehículos farmacológicos coloidales.

Entre las estrategias no invasivas, las nanopartículas poliméricas, especialmente las nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) (PBCA) revestidas con polisorbato 80, han recibido recientemente mucha atención por los neurocientíficos como un vehículo atractivo e innovador para dirigirse al cerebro. Estas nanopartículas pueden definirse como un sistema transportador farmacológico submicrométrico, que generalmente es de naturaleza polimérica. Dado que las nanopartículas son de pequeño tamaño, estas penetran fácilmente en pequeños capilares y pueden absorberse al interior de las células permitiendo una acumulación eficaz del fármaco en sitios diana en el organismo. Las primeras nanopartículas descritas se basaron en sistemas poliméricos no biodegradables. Sin embargo, su uso para administración sistémica, no podía tenerse en cuenta debido a la posibilidad de toxicidad crónica debido a la respuesta tisular e inmunológica contra el polímero no degradable. Por otro lado, se estudiaron exclusivamente nanopartículas preparadas con polímeros biodegradables, tales como poli(cianoacrilato). El uso de materiales biodegradables para la preparación de nanopartículas permite la liberación sostenida del fármaco en el sitio diana durante un periodo de días o incluso meses después de inyección.

Determinados insectos pueden ser adecuados como organismos modelo para estudiar la penetración de las NP a través de la BHE. Los insectos son organismos multicelulares con un sistema nervioso complejo compartimentalizado para funciones especializadas, como visión, olfato, aprendizaje y memoria. El sistema nervioso de los insectos responde fisiológicamente de modo similar al de los vertebrados con muchas neurohormonas y receptores idénticos. Los insectos tienen un sistema nervioso avascular en el que la hemolinfa baña al resto de las superficies de ganglios y nervios. Por lo tanto, muchos insectos requieren un sistema BHE sofisticado para proteger su SNC de neurotoxinas derivadas de plantas y para mantener un microentorno iónico apropiado de las neuronas. De hecho, así mismo en los insectos un sistema BHE sofisticado ha sido una ventaja evolutiva. En los insectos esta BHE está basado principalmente en el sistema de células gliales que por supuesto se traslada al sistema endotelial como una respuesta a la mayor importancia de la microvasculatura en el cerebro de vertebrados. Como apoyo a este punto de vista está la presencia del sistema glial en peces elasmobranchios y los vestigios de su barrera glial en el SNC de mamíferos modernos. Por tanto los insectos poseen una BHE que es un componente importante en el envainamiento del sistema nervioso. Las BHE en insectos son muy sofisticadas pero varían en cuanto a su estructura entre los diferentes órdenes de insectos. Por tanto los insectos con barreras hematoencefálicas altamente sofisticadas con componentes integradores complejos, que simulan las barreras de vertebrados, serán excelentes modelos para la documentación de la penetración de diversas moléculas a través de esta estructura.

El documento US20050132425A1 desvela una mosca transgénica que expresa la versión mutante Italiana del péptido Abeta42 humano de la proteína precursora beta amiloidea (APP) humana, y una mosca doble transgénica que expresa tanto la proteína Tau como el péptido Abeta42^{Italiano} humano de la proteína precursora beta amiloidea (APP) humana. Las moscas transgénicas proporcionan modelos de trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer. El documento US20050132425A1 describe adicionalmente métodos para identificar modificadores genéticos, así como métodos de exploración para identificar compuestos terapéuticos para tratar trastornos neurodegenerativos usando las moscas transgénicas.

El documento WO04006854A2 desvela un método para explorar el efecto de un agente de ensayo sobre una población de insectos que comprende las etapas de proporcionar una población de especímenes, administrar al menos un agente de ensayo a la población, crear una película digitalizada mostrando los movimientos de los insectos, medir al menos un rasgo de los insectos de la población con el efecto del agente de ensayo. El documento también proporciona un método para preparar un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad de mamíferos.

Marsh y Thompson (Neuron - 2006 - 52: 169-178) explican que los insectos son muy útiles como sistemas modelo debido a la simplicidad combinada con la rápida reproducibilidad. Algunos de los modelos (con *Drosophila*) han demostrado su eficacia para ensayar fármacos importantes y revelaron concordancia de eficacia farmacológica en moscas y mamíferos para enfermedades como Huntington, Parkinson y Alzheimer.

Marsh y Thompson (BioEssays - 2004 - 26: 485-496) sugieren que las enfermedades neurodegenerativas dominantes del hombre pueden modelarse fielmente en insectos, tales como *Drosophila* (mosca de la fruta), ya que presentan las características clave de estas enfermedades tales como degeneración que avanza lentamente, aparición tardía, formación de agregados de proteína anómalos, etc. De acuerdo con los autores la posibilidad de manipular tales organismos modificados por ingeniería genética permite identificar mecanismos patogénicos y ensayar rápidamente posibles regímenes farmacológicos. Los autores sugieren que el excelente acuerdo hasta ahora de los tratamientos farmacológicos que son eficaces en la supresión de la patología, tanto en moscas como en ratones, proporciona una creciente confianza de que los organismos modelo invertebrados pueden acelerar de manera productiva la identificación de agentes que son probablemente eficaces en el tratamiento de enfermedades en mamíferos.

Mokri-Moayyed *et al* (J. Med. Microbiol., 2008, 57: 106-110) desvelan un método para determinar el transporte de *E. coli* K1 a través de la barrera hematoencefálica (BHE) que comprende inyectar las bacterias a una langosta, incubar los insectos y diseccionar los cerebros de los insectos. Los autores no mencionan nanopartículas.

Hay una urgente necesidad de modelos de exploración más sofisticados en cuanto al descubrimiento de fármacos pero también en cuanto al ensayo de toxicidad del SNC de compuestos químicos comercializados con menos efectos conocidos sobre la función cerebral.

Por tanto, en el descubrimiento de fármacos existe una necesidad de explorar de modo eficaz las NP dirigidas a dianas dentro del SNC. Esta exploración se realiza preferentemente en modelos de insectos con función intacta de la BHE y contribuirá a una selección positiva de compuestos que penetran en la BHE de vertebrados.

También existe una creciente necesidad de un modelo de exploración seguro para el medio ambiente que pueda usarse para identificar las posibles nanopartículas peligrosas (para el medio ambiente) que entran en el cerebro.

Por tanto, existe una demanda de modelos intermedios que sean más fiables que los modelos *in vitro* y que al mismo tiempo sean más rápidos y asequibles que los modelos tradicionales de vertebrados *in vivo*.

Sumario de la invención

5 En un aspecto la presente invención se refiere al uso de insectos para estudiar la seguridad medioambiental de nanopartículas. Las partículas se administran en la hemolinfa de un insecto que tiene una BHE, tal como la langosta, y se analiza la captación en el cerebro. Por tanto, en este modelo es posible investigar la posible captación en el cerebro de nanopartículas circulantes en la sangre.

10 El objetivo global de la presente invención es desarrollar modelos de exploración con insectos para determinar la penetración de las diferentes NP a través de la barrera hematoencefálica. Este objetivo ofrece muchas ventajas con respecto a la tecnología anterior dado que los modelos de insecto son herramientas más fiables para los procesos de toma de decisiones que los modelos existentes *in vitro* y agilizarán los procesos de exploración y reducirán la tasa de abandono de fase avanzada. Además, reducirán el número de mamíferos sacrificados durante la fase de descubrimiento del fármaco.

15 Los autores de la presente invención han descubierto con sorpresa que la barrera hematoencefálica (BHE) en insectos seleccionados del grupo que consiste en cucarachas, langostas y polillas tiene más en común con la BHE de mamíferos que lo que previamente se suponía. Los insectos de la presente invención pueden por lo tanto servir como un modelo intermedio para la determinación de la penetración de las NP a través de la BHE.

20 La presente invención también puede proporcionar por primera vez estrategias lógicas para explorar compuestos portadores de NP para indicadores neurológicos, así como generar un sistema *in vivo* sencillo para determinar la penetración cerebral de las NP.

25 El descubrimiento de fármacos es un proceso largo y costoso que requiere una inmensa cantidad de recursos químicos y biológicos. En la presente invención las posibilidades de usar insectos como sistemas modelo se han aprovechado meticulosamente para mejorar los procesos de toma de decisión y reducir los costes durante la fase de descubrimiento del fármaco. Basándose en descubrimientos recientes los autores de la invención han considerado por completo que los modelos de insecto de la presente invención proporcionan una base mejor que la existente en modelos *in vitro* para la selección de compuestos a ensayar en vertebrados.

30 En un aspecto, la invención proporciona un método para explorar la penetración de una nanopartícula a través de la BHE, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 administrar la nanopartícula a insectos seleccionados de los órdenes que consisten en Blattodea, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera,
incubar los insectos durante un periodo comprendido entre 1 minuto y 1 mes
diseccionar el cerebro de los insectos
medir la concentración del agente de ensayo en los cerebros diseccionados.

40 En una realización preferida de la presente invención los insectos se seleccionan de los órdenes Acridoidea (langostas) y Blattodea (cucarachas).

45 La disección de los cerebros debe realizarse preferentemente inmediatamente después de sacrificar a los insectos. Como alternativa, los cerebros se diseccionan y se extirpan de insectos vivos.

50 Preferentemente, los cerebros diseccionados se homogenizan y se disgregan mediante ultrasonido y eventualmente se someten a lisis para obtener un líquido homogéneo que refleje la composición de los cerebros. El líquido se centrifuga y el sobrenadante se conserva hasta el análisis. El análisis posterior del líquido puede realizarse en virtud de cromatografía líquida, posiblemente con detección por espectrometría de masas de los compuestos eluidos. Como alternativa, la presencia de las NP en el cerebro puede identificarse y cuantificarse mediante métodos histoquímicos.

55 En diversos aspectos y realizaciones la presente invención proporciona la materia objeto expuesta en las reivindicaciones posteriores.

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención proporciona nueva metodología para explorar la penetración en la BHE de nanopartículas que entran en la corriente sanguínea. La invención es generalmente útil para la exploración a alto y medio rendimiento de nanopartículas desarrolladas en programas de descubrimiento de fármacos dirigidos a diversas enfermedades y trastornos, específicamente trastornos degenerativos incluyendo: Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Enfermedades con inclusiones de neuronas motoras, Tauopatías, degeneración Corticobasal, trastornos Neurosiquiátricos, incluyendo: enfermedad de Depresión Bipolar, Esquizofrenia, Ansiedad, Agresividad y tumores Cerebrales.

65

Una nanopartícula de acuerdo con la presente invención es una partícula con un tamaño entre 1 y 100 nanómetros. Existen diversos métodos para crear nanopartículas, incluyendo tanto la abrasión como la pirolisis. En la abrasión, las partículas a macro- o micro-escala se muelen en un molino de bolas o en otro mecanismo reductor de tamaño. Un plasma térmico también puede administrar la energía necesaria para producir la evaporación de partículas pequeñas de tamaño micrométrico. La condensación con gas inerte se usa frecuentemente para preparar nanopartículas a partir de metales con puntos de fusión bajos. El metal se evapora en una cámara de vacío y después se sobreenfría con una corriente de gas inerte. El vapor de metal sobreenfriado se condensa en partículas de tamaño manométrico, que pueden ser arrastradas en la corriente de gas inerte y depositarse sobre un sustrato o estudiarse *in situ*.

La presente invención se refiere, pero no se limita, al uso de insectos seleccionados de los siguientes órdenes: (Taxonomía de acuerdo con: Djurens Värld, Ed B.Hanström; Förlagshuset Norden AB, Maölmö, 1964):

Orden	Suborden/familia	Comentario
Dictyoptera	Blattoidea	Cucarachas
	Mantoidea	
Orthoptera	Grylloidea	Grillos
	Acridoidea	Saltamontes
Cheleutoptera		Insectos palo
Lepidoptera		Polillas
Hymenoptera	Formicoidea	Hormigas
	Vespoidea	Avispas
	Apoidea	Himenópteros como abeja
	Bombinae	Abejorros
	Apine	Abejas verdaderas
Odonata		Libélulas
Diptera	Nematocera	Mosquitos
	Brachycera	Moscas, por ejemplo, <i>Drosophila</i>

En particular la invención se refiere a especies de insectos seleccionadas de Blattoidea, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera y más particularmente a Acridoidea (*Locusta migratoria* y *Schistocera gregaria*).

La invención también se refiere a los siguientes órdenes que comprenden especies de insectos revelantes para el método de la presente invención:

Orden	Suborden/familia	Comentario
Ephemera		Efímeras
Plecoptera		
Dermoptera	Forficuloidea	Tijeretas
Homoptera	Cicadinea	Cigarras
	Aphidine	Piojos de las plantas
Heteroptera		Hemípteros
Coleoptera		Escarabajos
Trichoptera		Frigáneas

La presente invención utiliza preferentemente insectos grandes, tales como la langosta migradora, *Locusta migratoria* y la langosta del desierto, *Schistocera gregaria* o cucaracha donde es factible suministrar e inyectar nanopartículas y posteriormente extraer muestras de hemolinfa y tejidos cerebrales diseccionados para su análisis.

La langosta se ha utilizado para desarrollar modelos de exploración para comparar este modelo con los datos bibliográficos existentes de estudios de vertebrados convencionales *in vivo*.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la langosta migradora, *Locusta migratoria* y/o la langosta del desierto, *Schistocera gregaria*, se utilizan porque son fáciles de criar y son insectos relativamente grandes (40 - 60 mm de longitud, peso: aproximadamente 2 g, volumen de hemolinfa: aproximadamente 300 μ l, peso cerebral: aproximadamente 2 mg).

10 La aplicación de nanopartículas a los insectos de la presente invención en un método de exploración puede realizarse de la siguiente manera, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención.

Ejemplos

15 En una realización preferida de la presente invención los insectos se seleccionan del orden Acridoidea y específicamente se utilizan *Locusta migratoria* y *Schistocera gregaria*. Los insectos pueden obtenerse de proveedores locales o pueden reproducirse internamente. Los saltamontes se criaron en condiciones de hacinamiento a 28 °C, en un ciclo de oscuridad: luz de 12:12 y se alimentaron con hierba reciente y salvado. Antes de realizar los experimentos los saltamontes se alimentaron con trigo cultivado ecológicamente durante dos semanas. Los animales utilizados eran adultos macho (en algunos experimentos hembras) de entre dos a cuatro semanas después de la emergencia del adulto. Las nanopartículas se administraron en la hemolinfa de una manera similar a la descrita por Goldworthy *et al.* (2003). Para la determinación cuantitativa de la concentración de nanopartículas en el cerebro, estos se diseccionaron (se realizó un corte a través de la parte frontal de la cabeza de la langosta que comprende las partes más frontales incluyendo las antenas, los ojos compuestos, el cerebro y todas las conexiones neuronales entre el cerebro y las antenas y los ojos), se lavaron, se congelaron instantáneamente y se conservaron hasta su análisis. En el análisis, los cerebros se homogeneizaron/sometieron a agitación vorticial y se centrifugaron. El sobrenadante que contenía las nanopartículas se analizó con respecto a la concentración de fármaco por HPLC, LC/MSMS u otros métodos relevantes. El efecto del tratamiento farmacológico puede documentarse registrando los efectos farmacológicos sobre el comportamiento o mediante el uso de registros de señalización de nervios del sistema nervioso central.

30 A continuación la presente invención se ilustra con más detalle.

Ejemplo 1

35 En la hemolinfa de las langostas (*Locusta migratoria*) se inyectaron (20 μ l) nanopartículas de poliestireno fluorescentes modificadas con amina (100 nm). Después de 60 minutos la hemolinfa se recogió y se analizó la captación de las nanopartículas por parte de los hemocitos. Esta captación fue una captación altamente selectiva de las nanopartículas en células como macrófagos y sin acumulación en otros tipos de células. También se observó que las partículas se acumulaban en los lisosomas lo que en gran medida indicaba que las partículas eran captadas por endocitosis.

45 Conclusión: la captación de nanopartículas en células endocíticas de la hemolinfa de la langosta es idéntica a la captación *in vivo* de las nanopartículas por macrófagos de vertebrados (Sadauskas *et al.*, 2007). Esta observación es importante ya que la eliminación de nanopartículas de la circulación por macrófagos es muy eficaz (aproximadamente 90 % 60 minutos después de la administración en un estudio en ratón) pero también depende de la forma de la nanopartícula y este mecanismo de eliminación es por tanto es un determinante de la exposición de la nanopartícula en la barrera cerebral.

Ejemplo 2.

50 En la hemolinfa de las langostas se inyectaron nanopartículas de plata (NPP; 80 nm). Después de 3 y 24 horas los cerebros de las langostas se diseccionaron en solución salina, se extirpó la laminilla neural y los cerebros se lavaron dos veces en solución salina y después se colocaron en tubos que contenían ácido nítrico 100 μ l. El contenido de Ag se analizó por ICP-MS. A las 3 horas hubo una captación promedio de 0,58 ng de Ag por cerebro y a las 24 horas la captación había aumentado a 0,86 ng de Ag por cerebro. El contenido del fondo promedio de Ag en los cerebros de control fue de 0,36 ng por cerebro.

Ejemplo 3.

60 Se realizó un corte a través de la parte frontal de la cabeza de langostas hembra. Cada cerebro en su cutícula se colocó en una solución de NPP (80 nm) durante 3 horas. Los cerebros se diseccionaron en solución salina, se extirpó la laminilla neural, se lavaron dos veces en solución salina y después se colocaron en tubos que contenían ácido nítrico 100 μ l. El contenido promedio de Ag por cerebro fue de 4,82 ng, medido por ICP-MS.

65

Ejemplo 4.

Se realizó un corte a través de la parte frontal de la cabeza de langostas hembra. Cada cerebro en su cutícula se colocó en una solución de NPP (80 nm) durante 3 horas. Los cerebros se diseccionaron en solución salina, se extirpó la laminilla neural, se lavaron dos veces en solución salina y después se colocaron en tubos que contenían ácido nítrico 100 ul. El contenido promedio de Ag por cerebro fue de 6,40 ng, medido por ICP-MS.

Ejemplo 5.

Se diseccionaron cerebros de langosta en solución salina y se extirpó la laminilla neural. Los cerebros se colocaron en una solución de NPP (80 nm) durante 3 horas. Los cerebros se lavaron dos veces en solución salina y después se colocaron en tubos que contenían ácido nítrico 100 ul. El contenido promedio de Ag por cerebro fue de 21,7 ng, medido por ICP-MS.

Ejemplo 6.

En la hemolinfa de las langostas se inyectaron nanopartículas de plata (NPP; 57 nm). Después de 24 horas los cerebros de las langostas se diseccionaron en solución salina, se extirpó la laminilla neural y los cerebros se expusieron a azul de Evans. Hubo una notable captación de azul de Evans en las langostas tratadas con NPP mientras que no hubo captación en los cerebros de control.

Conclusiones: Similar a los hallazgos en vertebrados, el cerebro de la langosta capta las NPP *in vivo* y por tanto atraviesan la barrera cerebral de la langosta. La observación de la captación de azul de Evans después de 24 horas de exposición *in vivo* es similar a la encontrada para las NPP en un modelo de rata que muestra deterioro de la integridad de la BHE 24 horas después de administración i.v. (Sharma *et al.*, 2010). La exposición *ex vivo* aumentó notablemente la captación en el cerebro y la captación aumentó adicionalmente en el cerebro de la langosta cuando se expuso a las NPP después de extirpar la laminilla neural.

Ejemplo 7.

Se realizó un corte a través de la parte frontal de la cabeza de langostas hembra. Cada cerebro en su armazón cuticular se colocó en una solución de nanopartículas de poliestireno fluorescentes modificadas con amino (100 nm) durante 60 minutos. Los cerebros se diseccionaron en solución salina, se lavaron dos veces en solución salina y después se colocaron en tubos con paraformaldehído. Un análisis microscópico de la fluorescencia de las nanopartículas en cortes tisulares mostró una notable captación en la laminilla neural. Conclusión. Este estudio sustenta la diferencia encontrada en los estudios con NNP con y sin la laminilla neural en cuanto a la exposición a la solución de NNP.

Ejemplo 8.

Se diseccionaron cerebros de langosta en solución salina y se extirpó la laminilla neural. Los cerebros se colocaron en soluciones que contenían nanopartículas de poliestireno fluorescentes modificadas con amino (100 nm) y se expusieron durante 3 horas. Después, los cerebros se colocaron en tubos con paraformaldehído.

Un análisis microscópico de la fluorescencia de las nanopartículas en cortes tisulares mostró una notable captación en los cerebros de langosta de las nanopartículas modificadas con amino 100 nm y hubo un notable deterioro de la barrera.

Ejemplo 9.

Se diseccionaron cerebros de langosta en solución salina y se extirpó la laminilla neural. Los cerebros se colocaron en soluciones que contenían nanopartículas de poliestireno fluorescentes modificadas con amino (50 nm) y se expusieron durante 3 horas. Después, los cerebros se colocaron en tubos con paraformaldehído.

Un análisis microscópico de la fluorescencia de las nanopartículas en cortes tisulares mostró una notable captación en la región de la barrera cerebral de la langosta de las nanopartículas modificadas con amino 50 nm pero no hubo deterioro de la barrera.

Ejemplo 10.

Se diseccionaron cerebros de langosta en solución salina y se extirpó la laminilla neural. Los cerebros se colocaron en soluciones que contenían nanopartículas fluorescentes de poliestireno modificadas con carboxi (30 nm) y se expusieron durante 3 horas. Después, los cerebros se colocaron en tubos con paraformaldehído.

Un análisis microscópico de la fluorescencia de las nanopartículas en cortes tisulares mostró que en el cerebro de langosta no había captación de las nanopartículas modificadas con carboxi 30 nm.

Conclusión general:

5 La exposición *in vivo* de diversas nanopartículas a la hemolinfa de la langosta da como resultado la misma
 eliminación por captación de células endocíticas y captación sobre la barrera cerebral que en modelos de
 vertebrados. El modelado *ex vivo* en la langosta indica claramente la utilidad del modelo en estudios de penetración
 cerebral con referencia a las propiedades de tamaño y químicas de las nanopartículas. Las observaciones de los
 efectos sobre la integridad de la barrera cerebral es de extraordinaria importancia ya que los efectos de las
 10 nanopartículas sobre la penetración a través de la barrera cerebral debido a deterioro funcional a menudo no se
 entiende del todo y además se sugiere que las nanopartículas de PBCA revestidas con polisorbato 80 (ampliamente
 usadas para el transporte de fármacos al interior del cerebro) deterioran la BHE de vertebrados (Olivier, 2005).

Referencias

- 15 Banerjee y Baht (2007), Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation Annual Review of
 Neuroscience 30: 235-258.
 Di, L. y Kerns, E. H. (2003). Profiling drug-like properties in discovery research. Current Opinion in Chemical
 Biology 7,402-408.
 20 Gaertner, L. S., Murray, C. L., Morris, C. E. (1998). Transepithelial transport of nicotine and vinblastine in isolated
 malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggests a P-glycoprotein-like mechanism. The
 Journal of Experimental Biology 201, 2637-2645.
 Garberg, P. *et al.* (2005). In vitro models for the blood-brain barrier. Toxicology in Vitro 19, 299-334.
 Goldsworthy, G *et al.* (2003) Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in
 adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. J. Insect. Physiol., 49, 793-803.
 25 Gullan, P. J y Cranston, P. S. (2000). The insects. An outline of entomology. Blackwell Science Ltd.
 Marsh, J. L., y Thompson, L. M. (2004). Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? Bioessays 26,
 485-496.
 Marsh, J. L. y Thompson, L. M. (2006). Drosophila in the Study of Neurodegenerative Disease. Neuron 52, 169-
 178.
 30 Olivier, J. C. (2005). Drug transport to brain with targeted nanoparticles. J. American Soc. Exp Neuro Therapy, 2,
 108-119.
 Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. Nature Reviews
 Drug Discovery 1, 131-139
 Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss A., Casabo, V. G. (2007). Pharmacokinetics in drug discovery. Journal of
 35 Phar-maceutical Sciences, 1-37.
 Sadauskas, E. *et al.* (2007). Kupffer cells are central in removal of nanoparticles from the organism. Particle and
 Fibre Toxicology 19, 4-10.
 Schinkel, A. H. (1999). P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. Advanced Drug Delivery Reviews
 36, 179-194.
 40 Sharma, H. S. *et al.* (2010). Influence of nanoparticles on blood-brain barrier permeability and brain edema
 formation in rats. Acta Neurochir. Suppl., 106, 359-364.
 Summerfield, S. *et al.* (2005). Improving the In Vitro Prediction of In Vivo CNS Penetration: Integrating
 Permeability, Pgp Efflux and Free Fractions in Blood and Brain. Journal of Pharmacology And Experimental
 Therapeutics.
 45 Turksen, K. y Troy, T.-C. (2004). Barriers built on claudins. Journal of Cell Science 117, 2435-2447.
 Xia, C. Q., Xiao, G., Liu, N., Pimprale, S., Fox, L., Patten, C. J., Crespi, C. L., Miwa, G., Gan, L.-S. (2006).
 Comparison of Species Differences of P-Glycoproteins in Beagle Dog, Rhesus Monkey, and Human Using
 ATPase Activity Assays. Molecular Pharmaceutics 3 (1), 78-86.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar si una nanopartícula se transporta a través de la barrera hematoencefálica (BHE), comprendiendo dicho método las etapas de:
- administrar la nanopartícula a insectos que tienen una BHE,
 - incubar los insectos,
 - diseccionar los cerebros de los insectos, y
 - medir la concentración de la nanopartícula en los cerebros.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que los insectos se seleccionan del grupo que consiste en los órdenes Blattoidea, Diptera, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que los insectos se incuban durante un periodo comprendido entre 1 minuto y 1 mes, antes de diseccionar los cerebros de los insectos con el fin de cuantificar la concentración de la nanopartícula administrada en los cerebros.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la disección de los cerebros se realiza inmediatamente después de sacrificar a los insectos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la medición de la concentración de la nanopartícula se realiza homogeneizando los cerebros diseccionados, preferentemente centrifugando el homogeneizado y analizando por cromatografía líquida la concentración de la nanopartícula en el homogeneizado, posiblemente con detección por espectrometría de masas de los componentes eluídos.
- 30 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una nanopartícula se administra por vía parenteral o por vía oral.
- 35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la determinación de gradientes de concentración de las nanopartículas entre el cuerpo y el cerebro para determinar cuantitativamente la penetración de la BHE.
8. El uso de insectos seleccionados del grupo que consiste en los órdenes Blattodea, Diptera, Acridoidea, Cheleutoptera, Brachycera y Lepidoptera para determinar si una nanopartícula se transporta a través de la barrera hematoencefálica.