

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 105**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 31/7012 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10810868 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2512451**

54 Título: **Modulador**

30 Prioridad:

17.12.2009 GB 0922066

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST
(100.0%)
University Road
Belfast BT7 1NN Northern Ireland, GB**

72 Inventor/es:

**SCOTT, CHRISTOPHER;
JOHNSTON, JAMES;
SPENCE, SHAUN;
MCAULEY, DANNY y
FAY, FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 571 105 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

Modulador

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad pulmonar y cánceres sanguíneos, en particular a un dispositivo para el tratamiento de estados inflamatorios y leucemia, específicamente la leucemia mieloide aguda (AML; del inglés, acute myeloid leukaemia). Se refiere además a un método para el suministro de fármacos y a un dispositivo para el suministro de fármacos a tipos celulares particulares.

Antecedentes de la invención

10 Se sabe que la mediación aberrante de la respuesta inflamatoria por células conduce a enfermedad en diversos tipos celulares o tisulares, por ejemplo, estados inflamatorios del pulmón, incluyendo tuberculosis, trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD; del inglés, chronic obstructive pulmonary disorder), asma y lesión pulmonar aguda, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, SLE y enfermedades agudas y crónicas de la piel, incluyendo la dermatitis.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de identificar agentes que puedan ser empleados para el tratamiento de la inflamación, particularmente para inhibir una respuesta inflamatoria en células.

Sumario de la invención

20 Los inventores han determinado un método para proporcionar adecuadamente ácido siálico o compuestos análogos al mismo, que puede ser dirigido a células que comprenden receptores lectínicos de tipo inmunoglobulínico ligantes de ácido siálico (siglec), de modo que la unión de los ácidos siálicos a las células diana promueva una reducción de una respuesta inflamatoria en las células diana y el entorno asociado.

25 Además, dichas micropartículas o nanopartículas unidas a ácido siálico pueden ser utilizadas para suministrar fármacos a los tumores sanguíneos y de tipo linfoma ya que es sabido que tipos celulares que incluyen receptores lectínicos de tipo inmunoglobulínico ligantes de ácido siálico (siglec) están asociados con el cáncer sanguíneo, y en particular con la leucemia y los linfomas que representan del 6 al 8% de los cánceres totales diagnosticados en todo el mundo.

La presente invención proporciona ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de acuerdo con la Reivindicación 1. La presente invención proporciona un método para modular una respuesta inflamatoria en una célula de acuerdo con la Reivindicación 8.

30 En realizaciones, el método proporciona la supresión de una respuesta proinflamatoria. En realizaciones alternativas, el método proporciona el aumento de una respuesta antiinflamatoria. En realizaciones, la respuesta proinflamatoria puede ser suprimida en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%. En realizaciones alternativas, la respuesta antiinflamatoria puede ser aumentada en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o al menos 50%. En aún otras realizaciones, se puede proporcionar la supresión de una respuesta proinflamatoria y un aumento de una respuesta antiinflamatoria. Se pueden medir adecuadamente citocinas proinflamatorias, por ejemplo, TNF-alfa. En realizaciones, las citocinas proinflamatorias pueden incluir TNF-alfa e IL-6. Se pueden medir adecuadamente citocinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-10. La persona experta sabría de métodos de ensayo adecuados para medir tales citocinas, por ejemplo, el ensayo Bio-Plex™ (Bio-Rad) para citocinas.

40 Para determinar si una célula produce más o menos citocinas proinflamatorias, un método adecuado que puede ser utilizado es resuspender las células y sembrarlas en una cantidad de 2×10^5 células/ml y 200 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos. Luego se puede dejar que se adhieran a la placa durante la noche y se pueden tratar con LPS y ligandos durante 24 horas en un intervalo de concentraciones. Luego se puede separar el sobrenadante y almacenarlo a -70 °C. Luego se pueden evaluar los niveles de citocinas mediante un ensayo ELISA (R&D Systems). Como se apreciará, se puede aplicar un método similar para determinar citocinas antiinflamatorias.

45 En una realización, se pueden determinar adecuadamente los niveles de TNF- α revistiendo durante la noche una placa de 96 pocillos con un anticuerpo de captura para TNF- α , diluido en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) 1X. Todas las operaciones se pueden llevar a cabo a temperatura ambiental. Los pocillos pueden ser lavados tres veces en PBS 1X/monolaurato de polioxietileno-sorbitán (Tween 20) al 0,1% antes de ser bloqueados durante una hora con BSA (BDH) al 1% disuelta en PBS 1X. Se puede repetir la operación de lavado y se pueden añadir 50 μ l de sobrenadantes de células tratadas o patrones en concentraciones de 2000 pg/ml a 0 pg/ml a los pocillos y dejar la mezcla durante 2 horas. Posteriormente, se puede aspirar el sobrenadante y lavar los pocillos 3 veces y se pueden añadir 50 μ l de anticuerpo de detección para TNF- α , diluido en BSA al 1%/PBS 1X, durante 2 horas. Se pueden volver a lavar los pocillos tres veces y se puede añadir anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) en dilución 1 en 200 en BSA al 1%/PBS 1X durante 20 minutos. En esta fase se puede envolver la placa en una lámina de aluminio.

Una vez que se han lavado los pocillos, se puede añadir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 20 minutos y volver a proteger la placa de la luz. Se puede añadir ácido clorhídrico 1 M para detener la reacción y se puede leer la absorbancia a 450 nm en un dispositivo lector de placas. Luego se pueden extrapolar concentraciones de TNF- α a partir de la curva patrón. Como se apreciará, se puede aplicar una metodología similar para determinar otras citocinas.

En una realización, se pueden determinar adecuadamente los niveles de IL-10 revistiendo durante la noche una placa de 96 pocillos con un anticuerpo de captura para IL-10, diluido en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Todas las operaciones se pueden llevar a cabo a temperatura ambiental. Los pocillos pueden ser lavados tres veces en PBS 1X/monolaurato de polioxietileno-sorbitán (Tween 20) al 0,1% antes de ser bloqueados durante una hora con BSA (BDH) al 1% disuelta en PBS 1X. Se puede repetir la operación de lavado y se pueden añadir 50 μ l de sobrenadantes de células tratadas o patrones en concentraciones de 2000 pg/ml a 0 pg/ml a los pocillos y dejar la mezcla durante 2 horas. Posteriormente, se puede aspirar el sobrenadante y lavar los pocillos 3 veces y se pueden añadir 50 μ l de anticuerpo de detección para IL-10, diluido en BSA al 1%/PBS 1X, durante 2 horas. Se pueden volver a lavar los pocillos tres veces y se puede añadir anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en dilución 1 en 200 en BSA al 1%/PBS 1X durante 20 minutos. En esta fase se puede envolver la placa en una lámina de aluminio. Una vez que se han lavado los pocillos, se puede añadir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 20 minutos y volver a proteger la placa de la luz. Se puede añadir ácido clorhídrico 1 M para detener la reacción y se puede leer la absorbancia a 450 nm en un dispositivo lector de placas. Luego se pueden extrapolar concentraciones de IL-10 a partir de la curva patrón. Como se apreciará, se puede aplicar una metodología similar para determinar otras citocinas.

Para determinar *in vivo* si el animal produce una mayor o menor respuesta proinflamatoria, un método adecuado que puede ser empleado es el análisis de los niveles séricos de citocinas. Por ejemplo, esto puede ser llevado a cabo mediante la recogida de 50 μ l de sangre de la vena de la cola del animal usando un tubo capilar. Esta sangre es dejada coagular a temperatura ambiental durante 30 minutos antes de una centrifugación a 1300 rpm para obtener un sedimento de glóbulos rojos. El suero es separado por decantación en un tubo limpio de microcentrífuga y es analizado mediante un ensayo ELISA. Para un análisis más extenso se puede tomar un mayor volumen de sangre (aproximadamente 600 μ l – 1 ml) mediante punción cardiaca directa, lo que permite que se recoja un mayor volumen de suero y se analice mediante un ensayo ELISA u otra técnica similar. En este campo técnico se conocen otras técnicas adecuadas, particularmente para detectar y medir citocinas en seres humanos.

El sustrato puede ser revestido con, o unido a, ácido siálico o un compuesto análogo al ácido siálico. En la técnica se conocen compuestos análogos al ácido siálico. Dichos compuestos análogos pueden tener sustituyentes en la posición C9. Los compuestos análogos pueden incluir derivados del ácido neuramínico, sialósidos, y cualesquier azúcares que comprendan al menos una molécula de ácido neuramínico. Adecuadamente, el ácido siálico o un compuesto análogo al mismo pueden ser inmovilizados sobre la superficie del sustrato. El ácido siálico puede ser unido al sustrato directamente o por medio de un conector. El sustrato puede ser derivatizado o activado para permitir la unión del ácido siálico o el compuesto análogo. Alternativamente, el sustrato puede ser derivatizado o activado para permitir la unión de un conector a un sustrato, y el conector se puede unir al ácido siálico. Al revestir un sustrato con ácido siálico o un compuesto análogo al mismo o unir ácido siálico o un compuesto análogo al mismo a un sustrato, se puede adaptar un dispositivo que incluya dicho sustrato para que se dirija a una célula que comprende un receptor siglec para inducir la unión del receptor siglec de modo que la producción de citocinas proinflamatorias dentro de la célula resulte inhibida o la producción de citocinas antiinflamatorias resulte aumentada, suprimiéndose por ello una respuesta inmune proinflamatoria. El sustrato puede ser proporcionado a un dispositivo para obtener el dispositivo con ácido siálico no superficial. En realizaciones en que se proporciona un revestimiento a un dispositivo, el revestimiento puede ser resistente al lavado. En realizaciones, la unión de ácido siálicos a un sustrato o el revestimiento de un sustrato con ácido siálicos, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos, puede ser mediante enlaces covalentes. En realizaciones alternativas, el ácido siálico se puede unir al sustrato mediante fuertes enlaces no covalentes, por ejemplo, a través de un enlace de estreptavidina-biotina. Adecuadamente, se puede fijar una molécula de biotina al ácido siálico a través de un conector para crear una sonda que se puede unir a un dispositivo a través de un conector de estreptavidina (véase, por ejemplo, Blixt et al., *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 33, 31.007-31.019). Podrían utilizarse técnicas como las conocidas en este campo técnico para unir ácido siálico a polímeros o diferentes materiales de sustrato o revestir polímeros o diferentes materiales de sustrato con ácido siálico, según se requiera. Por ejemplo, la superficie de un sustrato puede ser superficialmente funcionalizada para permitir la unión e inmovilización del ácido siálico o un compuesto análogo al mismo sobre dicha superficie.

El sustrato puede ser un dispositivo para suministro de fármacos. El sustrato puede ser un biomaterial, por ejemplo, un dispositivo médico implantable, por ejemplo, un implante protésico, un soporte o similar. Un dispositivo médico implantable puede estar formado de material plástico, metal u otro material biocompatible y/o bioestable, como se conocen en la técnica. En otras realizaciones, el sustrato puede ser un punto cuántico o similar.

Por "presentado sobre un sustrato" se quiere significar que el ácido siálico o los compuestos análogos al mismo se proporcionan sobre el sustrato de modo que estén disponibles para unirse a un receptor siglec sobre una célula. Adecuadamente, se pueden proporcionar tanto para que se unan al receptor como para que lo activen. Sin

pretender un respaldo teórico, se cree que la presentación del ácido siálico sobre un sustrato causa que el ácido siálico se proporcione en una densidad de concentración tal que se modula la respuesta inflamatoria.

5 El sustrato proporciona una superficie para la presentación o exposición del ácido siálico o un compuesto análogo al mismo. De este modo, el sustrato actúa como un andamio para disponer el ácido siálico o un compuesto análogo al mismo sobre la superficie de un dispositivo, por ejemplo, una nanopartícula o micropartícula o un biomaterial, que puede ser luego utilizado para suministrar un agente terapéutico a una célula. El sustrato puede proporcionar un complejo multivalente del ácido siálico que permite la unión a receptores siglec para proporcionar la modulación de la respuesta inflamatoria. La presentación de ácido siálico o un compuesto análogo al mismo sobre el sustrato de 10 una nanopartícula puede proporcionar una incorporación aumentada de la nanopartícula por una célula, de al menos un factor de dos, al menos un factor de tres, al menos un factor de cuatro, al menos un factor de cinco, al menos un factor de seis o al menos un factor de 10.

15 El ácido siálico o compuestos análogos al mismo se pueden presentar sobre el sustrato en grupos de al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 25, al menos 50, al menos 100, al menos 200 o al menos 400. El ácido siálico o compuestos análogos al mismo se pueden espaciar sobre la superficie del sustrato para que ellos o el sustrato se puedan unir a más de un receptor siglec. El ácido siálico o compuestos análogos al mismo se pueden espaciar sobre la superficie del sustrato para que ellos o el sustrato se puedan unir a múltiples receptores siglec presentados sobre tipos celulares individuales, que pueden variar en la cantidad de receptores siglec presentados sobre su membrana plasmática.

20 En dichas realizaciones, el sustrato puede ser un dispositivo para suministro de fármacos o se puede aplicar a un dispositivo para suministro de fármacos.

En realizaciones, un dispositivo para suministro de fármacos puede ser una micropartícula con una anchura mayor en corte transversal que sea inferior a 1000 micrómetros y que sea superior o igual a 1 micrómetro. Dicha micropartícula puede ser particularmente eficaz para uso en el tratamiento de enfermedades del pulmón.

25 En realizaciones alternativas, un dispositivo para suministro de fármacos puede ser una nanopartícula. Adecuadamente, la unión del ácido siálico o el compuesto análogo a ácido siálico presentado sobre una nanopartícula a un receptor siglec de una célula puede inducir la unión del receptor siglec y la internalización de la nanopartícula. Cuando se proporciona un fármaco mediante la nanopartícula, el fármaco de la nanopartícula puede ser luego específicamente suministrado a la célula dentro de la célula.

30 En realizaciones, una nanopartícula de la invención puede tener un diámetro o anchura mayor en corte transversal inferior a 1000 nm, inferior a 500 nm, inferior a 250 nm o inferior a 200 nm. En realizaciones, una nanopartícula puede tener una anchura superior a 1 nm, superior a 10 nm, superior a 50 nm o superior a 100 nm. En realizaciones, una nanopartícula revestida con ácido siálico o un compuesto análogo a ácido siálico puede tener un diámetro o anchura mayor en corte transversal en el intervalo de 130 nm a 170 nm, más preferiblemente una anchura de aproximadamente 150 nm. En realizaciones, este intervalo de tamaños puede ser de anchuras medias de 35 nanopartículas. En realizaciones, al menos el 80% de las nanopartículas se encuentran dentro de un intervalo descrito.

40 Adecuadamente, en realizaciones, aproximadamente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, de las partículas tienen una anchura mayor en corte transversal de entre 130 nm y 170 nm. En realizaciones, las partículas pueden tener una anchura mayor media en corte transversal de 150 nm, no teniendo las partículas una anchura superior o inferior a un valor no dentro de una desviación estándar de 150 nm. En realizaciones, una nanopartícula puede tener un volumen igual al de una esfera con un diámetro de entre 10 nm y 500 nm, adecuadamente de entre 50 nm y 250 nm, o de 100 nm a 200 nm, o de 130 nm a 170 nm.

45 En realizaciones del método en que se proporciona el sustrato mediante una nanopartícula, los inventores han determinado que la unión a un receptor siglec sobre una célula puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias por la célula e inducir citocinas antiinflamatorias. En realizaciones, la unión al receptor siglec puede inducir la internalización de la nanopartícula en la célula. En realizaciones en que se proporciona el sustrato mediante una nanopartícula, la unión de una nanopartícula a un receptor siglec sobre una célula puede dar lugar a la activación del receptor y puede inducir la internalización del receptor y la nanopartícula en la célula. Se ha observado que la producción de citocinas proinflamatorias por la célula resulta inhibida y/o se ha observado que la 50 producción de citocinas antiinflamatorias resulta aumentada después de la internalización de una nanopartícula como la discutida en esta memoria, suprimiéndose por ello una respuesta inmune proinflamatoria.

Como se apreciará, en realizaciones, una nanopartícula o micropartícula puede también incluir un agente activo que puede ser específicamente suministrado a una célula que expresa un receptor siglec, por ejemplo, a células asociadas con leucemia y linfomas.

55 En realizaciones, una nanopartícula para uso en el tratamiento de un linfoma puede ser cargada con doxorubicina. Dichas nanopartículas pueden incluir un sustrato que comprenda un ácido siálico que tenga especificidad y afinidad de unión por miembros, específicos de células B, de la familia de las lectinas de tipo Ig ligantes de ácido siálico

(siglec), por ejemplo, ácido siálico con enlace α 2-6, en particular un ácido trisacárido-siálico basado en NeuA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, más particularmente 9-N-bifenilcarboxil-NeuA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc (^{BFC}NeuAc).

La presentación de ácido siálico o compuestos análogos por un sustrato puede permitir que la nanopartícula que comprende el sustrato resulte internalizada por una célula.

5 Adecuadamente, la internalización de nanopartículas por una célula después de la unión y/o activación de un receptor siglec puede ser visualizada por microscopía confocal. Por ejemplo, en un método para determinar la internalización de nanopartículas, se pueden cultivar células RAW 264.7 en medio DMEM que contiene L-glutamina, penicilina/estreptomycin y suero de ternera fetal al 10% (volumen/volumen). En dicho método, se pueden sembrar células sobre cubreobjetos en placas de seis pocillos, en una cantidad de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo, y dejarlas crecer durante la noche. Esto puede ir seguido de 3 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 5% en medios exentos de suero con 100,0 μ l de una dispersión de nanopartículas cargadas de colorante y conjugadas con ácido siálico o nanopartículas no conjugadas, suspendidas en una cantidad de 100 μ g/ml en PBS. Las células pueden ser lavadas tres veces con PBS y ser luego fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 1 hora y lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo, durante 30 minutos, en tampón de HEPES, pH de 8. Para la tinción de núcleos, las células pueden ser incubadas con una disolución 1/200 de disolución de yoduro de TO-PRO[®]-3 (Invitrogen) y ser posteriormente lavadas 3 veces con PBS. Luego se pueden montar los cubreobjetos sobre portaobjetos de microscopio utilizando el reactivo Slow Fade[®] Gold (Invitrogen) y se puede llevar a cabo el análisis de las muestras utilizando microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania). La excitación se puede realizar utilizando iluminación por láser de 488 nm para fluorescencia verde, 543 nm para fluorescencia roja y 633 nm para fluorescencia roja lejana. Luego se puede evaluar la internalización de las nanopartículas considerando los patrones de fluorescencia.

Mediante la expresión "ácido siálico" se quiere significar cualquier ácido monosíalico o ácido polisíalico, incluyendo ácidos disíalicos que se pueden unir a un receptor siglec, en particular un ácido siálico con especificidad ligante hacia receptores siglec inhibitorios, tal como siglec 7. El ácido siálico puede ser cualquier grupo de amino-carbohidratos que son componentes de mucoproteínas y glicoproteínas en células tisulares y sanguíneas de animales. Los ácidos siálicos (también conocidos como ácidos no ulosónicos) son miembros de una familia de azúcares que contienen amino y 9 o más átomos de carbono, tal como, por ejemplo, el ácido N-acetilneuramínico [también conocido como ácido 5-(acetilamino)-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-2-no ulosónico, ácido lactamínico y ácido O-siálico].

30 Los ácidos siálicos pueden ser ácidos monosíalicos o ácidos polisíalicos, incluyendo ácidos disíalicos.

Los ácidos polisíalicos pueden presentar enlaces 2 \rightarrow 8 y/o 2 \rightarrow 9 y/o 2 \rightarrow 6 y/o 2 \rightarrow 3, normalmente en configuración α .

35 Cuando los ácidos siálicos unidos a, o que revisten, el sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos, son ácidos polisíalicos, pueden tener menos de 5 unidades de ácido siálico, preferiblemente menos de 4 unidades de ácido siálico, una longitud inferior a 3 unidades de ácido siálico, lo más preferiblemente una longitud de 2 unidades de ácido siálico.

Los ácidos siálicos o compuestos análogos a los mismos que están unidos a, o revisten, el sustrato pueden ser ácidos monosíalicos.

40 Cuando se emplea un compuesto análogo a ácido siálico, el compuesto análogo puede ser un compuesto mimético estructural de un ácido siálico como el descrito en esta memoria que se puede unir a ciertos siglecs, pero carece del ácido siálico del ligando de siglec natural. En la técnica se conocen compuestos análogos adecuados. Se cree que la característica que influye en la unión del ligando de ácido siálico a un receptor siglec es la relación de carga-distancia-coordinación entre la funcionalidad de ácido carboxílico del ácido siálico.

45 En realizaciones de la presente invención, el sustrato de un dispositivo tal como una micropartícula o una nanopartícula o como un revestimiento sobre un dispositivo, se puede proporcionar con un ácido siálico seleccionado de NeuA α 2-8NeuAc.

Un ácido siálico para uso puede ser seleccionado de acuerdo con el receptor siglec al que se dirige, en donde la preferencia de unión por siglecs particulares se puede seleccionar de la Tabla 1.

Tabla 1

siglec 1	NeuA α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
siglec 2	NeuA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc6S
siglec 3	NeuA α 2-6Gal β 1-4GlcNAc

siglec 4	NeuAca2-3Galβ1-4GalNAc
siglec 5	NeuAca2-8NeuAc
siglec 6	NeuAca2-8NeuAc
siglec 7	NeuAca2-8NeuAca2-3Galβ1-4Glc
siglec 8	NeuAca2-3Gal6Sβ1-4GlcNAca2-3Fu
siglec 9	Neu Aca2-3Galβ1-4GlcNAc6Sa2-3Fuc
siglec 10	NeuAca2-6Galβ1-4GlcNAc
siglec 11	NeuAca2-8NeuAc
siglec 14	NeuAca2-8NeuAc
siglec 15	NeuAca2-6GalNAc
siglec 16	NeuAca2-8NeuAc

De acuerdo con la especificidad deseada, se pueden proporcionar apropiados ligandos de ácido siálico o compuestos análogos al sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos.

El sustrato se proporciona con ácido alfa-2-8-acetilneuramínico.

5 El sustrato forma una micropartícula o nanopartícula revestida.

En realizaciones alternativas, el sustrato es una micropartícula o una nanopartícula; por ejemplo, la nanopartícula está exclusivamente formada por el sustrato. En dichas realizaciones, un polímero con el ácido siálico unido a él puede formar el dispositivo; por ejemplo, un polímero tal como PLGA puede formar el dispositivo para suministro de fármacos, por ejemplo, una nanopartícula.

10 Se puede utilizar adecuadamente cualquier material adecuado que se conozca en la técnica para formar una micropartícula o nanopartícula; por ejemplo, oro, poliestireno, polímeros biodegradables, liposomas, alginato, quitosano, complejos de albúmina-fármaco, y puntos cuánticos. En realizaciones, estos serán el material de sustrato.

15 Las nanopartículas liposómicas son vehículos de suministro conocidos que permiten encapsular cargas terapéuticas y pueden presentar ligandos en su superficie. Los expertos en la técnica conocen formulaciones liposómicas adecuadas y es conocida la química apropiada para fijar ligandos (en la presente invención, un ácido siálico o un compuesto análogo al mismo) a la superficie de tales liposomas. En realizaciones, un conector fijado a un ácido siálico va a ser inmovilizado en la superficie de la nanopartícula, por ejemplo, un liposoma. El conector se puede disponer entre el ácido siálico y la superficie del sustrato.

20 Adecuadamente, en realizaciones, se pueden administrar parenteralmente nanopartículas o micropartículas. Después de la administración parenteral las nanopartículas se pueden acumular selectivamente en tejidos o zonas corporales particulares. En realizaciones, las nanopartículas pueden suministrar una carga terapéutica a la célula o el tejido. En realizaciones, las nanopartículas pueden acceder a un tejido enfermo a través de un efecto potenciado de permeabilidad y retención.

25 En realizaciones, una micropartícula o nanopartícula puede ser una partícula polimérica; en particular, se puede formar una partícula a partir de un poliéster biodegradable tal como polilactida (PLA), poliglicolida (PGA), poli(cianoacrilato de butilo) (PBCA), o copolímeros de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA). Se formula una composición farmacéutica de la invención para que sea compatible con su prevista vía de administración. Los ejemplos de vías de administración incluyen las administraciones parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal y poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), que se han utilizado en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. En la técnica se conocen polímeros adecuados para uso como un sustrato, en donde el sustrato puede formar una nanopartícula o un dispositivo médico. En realizaciones, una partícula polimérica puede estar hecha de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

35 Aunque los polímeros de PLGA pueden poseer grupos carboxílicos terminales libres, muchos de estos pueden estar enterrados en la matriz de la partícula y no estar disponibles para unirse sobre la superficie de la partícula. En

- realizaciones, se pueden introducir más grupos carboxílicos en la partícula proporcionando un agente tensioactivo o revestimiento de un segundo polímero o copolímero además del primer polímero o copolímero de PLGA de la partícula. Adecuadamente, el segundo polímero o copolímero puede ser ramificado o lineal y puede tener una pluralidad de grupos alquilo terminales, en donde un grupo alquilo contiene sólo carbono e hidrógeno y forma la serie homóloga con la fórmula general C_nH_{2n+1} . En realizaciones de la invención, las moléculas de ácido siálico o los compuestos análogos pueden ser fijados a la partícula, por ejemplo, una nanopartícula polimérica, a través de un enlace covalente.
- En realizaciones, el sustrato puede ser un polímero que comprende ácido siálico en una concentración en el intervalo de 1 ng/mg de ácido siálico a polímero a 1 mg/mg de ácido siálico a polímero, preferiblemente de 10 ng/mg a 100 µg/mg, y lo más preferiblemente de 10 a 15 µg de ácido siálico por miligramo de polímero. En realizaciones, se puede revestir un dispositivo con dicho sustrato. En realizaciones alternativas, se puede formar un dispositivo a partir de un polímero, en donde el dispositivo es una micropartícula o nanopartícula, en donde el ácido siálico se proporciona al polímero en una concentración en el intervalo de 1 ng/mg de ácido siálico a polímero a 1 mg/mg de ácido siálico a polímero, preferiblemente de 10 ng/mg a 100 µg/mg, y lo más preferiblemente de 10 a 15 µg de ácido siálico por miligramo de polímero.
- De acuerdo con un segundo aspecto, se describe un método para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto que lo necesita, método que comprende administrar al sujeto ácido siálico o un compuesto análogo al mismo, en donde el ácido siálico o el compuesto análogo se presentan sobre un sustrato de modo que se suprime una respuesta inmune proinflamatoria o se aumenta una respuesta inmune antiinflamatoria en el sujeto.
- El sustrato puede ser un dispositivo para suministro de fármacos, por ejemplo, una micropartícula o una nanopartícula. En realizaciones, el dispositivo para suministro de fármacos puede ser adaptado para que se dirija a una célula que comprende un receptor siglec para inducir la activación del receptor siglec.
- Adecuadamente, dicho método puede comprender:
- identificar un sujeto que presenta una respuesta inmune proinflamatoria y/o padece un trastorno asociado con, o causado por, una respuesta inmune proinflamatoria, o que presenta riesgo de desarrollar una respuesta inmune proinflamatoria o un trastorno asociado con, o causado por, una respuesta inmune proinflamatoria; y
 - administrar al sujeto ácido siálico o compuestos análogos al mismo, en donde el ácido siálico o los compuestos análogos se presentan sobre un sustrato.
- El sustrato puede ser un dispositivo para suministro de fármacos, preferiblemente una nanopartícula a la que están unidos el ácido siálico o los compuestos análogos al mismo.
- Alternativamente, el método puede comprender:
- identificar un sujeto que presenta una respuesta inmune proinflamatoria y/o padece un trastorno asociado con, o causado por, una respuesta inmune proinflamatoria, o que presenta riesgo de desarrollar una respuesta inmune proinflamatoria o un trastorno asociado con, o causado por, una respuesta inmune proinflamatoria; y
 - recomendar la administración de ácido siálico o compuestos análogos al mismo, en donde el ácido siálico o los compuestos análogos se presentan sobre un sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos, preferiblemente una nanopartícula a la que están unidos el ácido siálico o los compuestos análogos al mismo.
- El método puede ser utilizado para tratar a un sujeto con cáncer, en particular para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda.
- El método puede ser utilizado para tratar a un sujeto con una enfermedad pulmonar. La enfermedad pulmonar puede incluir estados inflamatorios y no inflamatorios del pulmón, incluyendo tuberculosis (TB), trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), asma, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis quística, bronquiectasia, fibrosis pulmonar y otras formas de enfermedad pulmonar intersticial, y enfermedad vascular pulmonar.
- El método puede ser empleado para el tratamiento de enfermedades que incluyen: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, choque séptico, enfermedad cardíaca y vascular, lesiones renales agudas y crónicas por una diversidad de causas, diversas enfermedades cutáneas crónicas y nasales que incluyen dermatitis, estados autoinmunes tales como diabetes, SLE, y esclerosis múltiple.
- En realizaciones particulares, el ácido siálico o los compuestos análogos al mismo presentados sobre un sustrato se proporcionan como una nanopartícula. Adecuadamente, dicha nanopartícula puede ser utilizada para tratar una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, inflamación pulmonar o sistémica, rechazo de tejidos y daño por reperfusión.
- En consecuencia, se describe un método para la profilaxis y/o el tratamiento de un estado mediado por el sistema inmune, método que comprende: administrar ácido siálico o compuestos análogos al mismo presentados por un

sustrato, preferiblemente una nanopartícula, de modo que se suprima una respuesta inmune proinflamatoria en una célula o se aumente una respuesta inmune antiinflamatoria en el sujeto.

Se describe una composición que comprende ácido siálico o compuestos análogos al mismo presentados sobre un sustrato, preferiblemente una nanopartícula, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

- 5 Se describe el uso de ácido siálico o compuestos análogos al mismo presentados sobre un sustrato, preferiblemente una nanopartícula, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

El método puede ser utilizado para tratar a un sujeto con cáncer, en particular para el tratamiento de la leucemia mielóide aguda. El método puede ser utilizado para tratar a un sujeto con una enfermedad pulmonar. La enfermedad pulmonar puede incluir estados inflamatorios y no inflamatorios del pulmón, incluyendo tuberculosis (TB), trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), asma, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis quística, bronquiectasia, fibrosis pulmonar y otras formas de enfermedad pulmonar intersticial, y enfermedad vascular pulmonar. El método puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades que incluyen: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, choque séptico, enfermedad cardíaca y vascular, lesiones renales agudas y crónicas por una diversidad de causas, diversas enfermedades cutáneas crónicas y nasales que incluyen dermatitis, estados autoinmunes tales como diabetes, SLE, inflamación sistémica, rechazo de tejidos y daño por reperfusión y esclerosis múltiple.

Se ha determinado un fácil planteamiento para la formulación de nanopartículas que comprenden ácido siálico o compuestos análogos al mismo que pueden inducir la activación de un receptor siglec para que el receptor se internalice en la célula y resulte inhibida la producción de una citocina proinflamatoria, por ejemplo, TNF-alfa, por la célula, suprimiéndose de este modo una respuesta inmune proinflamatoria.

En consecuencia, un tercer aspecto es un método para producir un sustrato revestido con, o unido a, ácido siálico o un compuesto análogo a ácido siálico para, por ejemplo, proporcionar un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantado, en donde el método comprende:

- 25 – activar un polímero que forma un sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable, o que reviste un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable;
- proporcionar una disolución de ácido siálico al sustrato polimérico activado, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable;
- asociar el ácido siálico con el sustrato polimérico; y
- 30 – eliminar el ácido siálico no conjugado en exceso del sustrato activado, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable.

El método puede comprender las operaciones de activar el sustrato, proporcionar el ácido siálico o el compuesto análogo al mismo, y asociar el ácido siálico con el sustrato. El ácido siálico se puede asociar con el sustrato a través de un enlace éster.

- 35 En realizaciones, se pueden conjugar ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos con una nanopartícula usando la química de carbodiimidias.

En una realización particular en donde el sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable, es una nanopartícula, la formación puede comprender disolver 20 mg de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) en DCM y acetona, inyectar luego esta disolución, bajo agitación moderada, en una disolución, enfriada con hielo, que contiene PVA al 2,5% (peso/volumen) y $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 45% (peso/volumen) en tampón de MES, pH de 5, someter ambas fases a sonicación en un baño de hielo, añadir una disolución de PVA al 2,5% (peso/volumen) en tampón de MES, pH de 5, bajo agitación moderada y dejar que se evaporen los disolventes orgánicos. Las nanopartículas pueden ser luego separadas por centrifugación a 85.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y ser lavadas usando ciclos de suspensión-centrifugación con tampón de MES, pH de 5, antes de una resuspensión para obtener 5 mg de PLGA/ml en disolución de tampón de MES, pH de 5.

En realizaciones, la conjugación de nanopartículas puede comprender añadir 200 µl de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M a una cantidad igual (200 µl) de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,7 M, ambos disueltos en tampón de MES, pH de 5,0, añadir esta mezcla a una suspensión de nanopartículas, en donde la suspensión de nanopartículas formada se puede dejar a temperatura ambiental durante 1 hora bajo agitación moderada, y centrifugar la suspensión para eliminar los reactivos adsorbentes no utilizados. Se puede añadir 1 ml de suspensión de nanopartículas activadas en concentración de 1 mg/ml en PBS a 10 µl de una disolución de α,2-8-NANA en concentración de 10,0 mg/ml e incubar la mezcla a 4 °C durante la noche. Finalmente, se pueden centrifugar las disoluciones a 20.000 x g durante 1 hora a 10 °C y resuspender en PBS para eliminar el exceso de α,2-8-NANA no conjugado.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se describe un sustrato que comprende ácido siálico o un compuesto análogo al mismo, en particular en donde se forma dicho sustrato mediante un método de acuerdo con el tercer aspecto, en donde el sustrato está adaptado para que se dirija a una célula que comprende un receptor siglec e inhiba la producción de citocinas proinflamatorias dentro de la célula o aumente la producción de citocinas antiinflamatorias dentro de la célula, suprimiéndose por ello una respuesta inmune proinflamatoria.

Como se indicó anteriormente, los métodos para determinar el nivel de una citocina proinflamatoria dentro de una célula o de una citocina antiinflamatoria en una célula son bien conocidos en la técnica. De este modo, la persona experta podría determinar funcionalmente si el sustrato puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias dentro de la célula o aumentar la producción de citocinas antiinflamatorias dentro de la célula, suprimiendo de este modo una respuesta inmune proinflamatoria.

El sustrato puede presentar un ácido siálico o un compuesto análogo al mismo sobre una superficie del sustrato para que el ácido siálico o el compuesto análogo se pueda unir a un receptor siglec. El ácido siálico puede ser inmovilizado sobre la superficie del sustrato de modo que el ácido siálico se proporcione en una concentración de densidad que inhiba la producción de una citocina proinflamatoria o aumente la producción de una citocina antiinflamatoria.

El sustrato puede formar o revestir, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos o un dispositivo médico implantable. Se puede revestir el sustrato con ácido siálico o se puede revestir un dispositivo con un compuesto análogo ácido siálico. Alternativamente, el sustrato se puede unir a ácido siálico o un compuesto análogo a ácido siálico y formar el dispositivo.

El sustrato puede ser un polímero que comprende ácido siálico en una concentración en el intervalo de 1 ng/mg de ácido siálico a polímero a 1 mg/mg de ácido siálico a polímero, preferiblemente de 10 ng/mg a 100 µg/mg, y lo más preferiblemente de 10 a 15 µg de ácido siálico por miligramo de polímero. Se puede revestir un dispositivo con dicho sustrato. Alternativamente, se puede formar un dispositivo a partir de un polímero, por ejemplo, en donde el dispositivo es una micropartícula o nanopartícula, en donde el ácido siálico se proporciona al polímero en una concentración en el intervalo de 1 ng/mg de ácido siálico a polímero a 1 mg/mg de ácido siálico a polímero, preferiblemente de 10 ng/mg a 100 µg/mg, y lo más preferiblemente de 10 a 15 µg de ácido siálico por miligramo de polímero.

Un dispositivo para suministro de fármacos puede comprender además un fármaco terapéutico encerrado o adsorbido en el dispositivo; por ejemplo, el dispositivo puede ser una nanopartícula o micropartícula de modo que se suministre el fármaco terapéutico a una célula diana que expresa un receptor siglec. Los apropiados ácidos siálicos presentes sobre la nanopartícula pueden ser empleados para dirigir el dispositivo a células particulares que portan receptores siglec particulares.

Un dispositivo para suministro de fármacos, tal como una nanopartícula, puede comprender además al menos uno de entre un antibiótico, un agente antiviral, un antiinflamatorio, una citocina, un inhibidor de citocinas, un agente inmunomodulador, una inmunotoxina, un agente antiangiogénico, un agente antihipertensor, un agente antiedematoso, un agente radiosensibilizador, un oligonucleótido que comprende DNA o RNA, un péptido, un agente anticanceroso y combinaciones de los mismos. Adecuadamente, se puede seleccionar un agente anticanceroso de entre al menos uno de citarabina, daunorrubicina, etopósido, fludarabina, idarrubicina, doxorubicina, desoxidoxorrubicina, morfolinodoxorrubicina, 5-fluorouracilo, captotecina o un derivado de la misma, metotrexato o un derivado del mismo, cisplatino, metronidazol, camptotecina y una combinación de los mismos.

Además, se puede suministrar una diversidad de fármacos establecidos y nuevos mediante un dispositivo de suministro que comprende un sustrato, por ejemplo, la superficie de una nanopartícula, unido a ácido siálico o un compuesto análogo al mismo. En particular, se puede suministrar un fármaco al pulmón mediante un dispositivo de la invención. Adecuadamente, dichos fármacos pueden comprender beta-agonistas, antibióticos, anti-proteasas, antiinflamatorios que incluyen esteroides y estatinas, proteínas humanas recombinantes, tales como, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento de queratinocitos, y fármacos vasoactivos.

Adecuadamente, se puede administrar un dispositivo para suministro de fármacos, por ejemplo, una micropartícula o nanopartícula, a un sujeto junto con un vehículo o excipiente farmacéutico para, por ejemplo, facilitar el suministro de la nanopartícula a tipos celulares particulares.

Un quinto aspecto es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un dispositivo para suministro de fármacos que comprende un sustrato unido a ácido siálico o un compuesto análogo al mismo, como se describe en el cuarto aspecto.

Se puede proporcionar un sustrato, por ejemplo, un dispositivo para suministro de fármacos, revestido con, o unido a, ácido siálico o un compuesto análogo a ácido siálico de modo que el dispositivo para suministro de fármacos se adapta para que se dirija a una célula que comprende un receptor siglec e inhiba la producción de citocinas proinflamatorias y/o aumente la producción de citocinas antiinflamatorias, con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Un dispositivo para suministro de fármacos puede ser una nanopartícula revestida

con el sustrato al que está unido ácido siálico o un compuesto análogo a ácido siálico.

Los presentes inventores han determinado que nanopartículas de PLGA revestidas con ácido siálico son estables frente a la liofilización, lo que permite que se las emplee útilmente para el suministro pulmonar de fármacos. Adecuadamente, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del pulmón y otras enfermedades similares, puede ser preferible proporcionar las nanopartículas de la presente invención como una formulación en aerosol.

Las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", cantidad que es suficiente para producir un beneficio al individuo. El régimen de dosificación real dependerá de un número de factores que incluyen el estado que se trata, su gravedad, el paciente que se trata y el agente que se utiliza, y será a criterio del médico.

La dosis óptima puede ser determinada por médicos basándose en un número de parámetros que incluyen, por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la gravedad del estado que se trata, el ingrediente activo que se administra y la vía de administración.

Las características y realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los demás aspectos *mutatis mutandis*, a menos que el contexto exija otra cosa.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto exija otra cosa, se entenderá que los términos "comprender" e "incluir", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", implican la inclusión de un expresado número entero o grupo de números enteros pero no la exclusión de ningún otro número entero ni grupo de números enteros.

Se describirán ahora realizaciones de la presente invención sólo a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

En la Figura 1 (A) se proporciona una representación esquemática de una nanopartícula de PLGA con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos (ácido siálico) conjugados sobre su superficie; en la 1 (B) se ilustra el PLGA, y en la 1 (C) se ilustra el ácido alfa-2-8-diacetilneuramínico.

En la Figura 2 se proporciona una tabla que indica las eficacias de conjugación típicas de los ácidos disialicos con las nanopartículas, y las cantidades exitosamente fijadas por miligramo de PLGA.

En la Figura 3 se ilustra (A) el tamaño de partícula y el potencial zeta de nanopartículas (NP) de PLGA conjugadas o no conjugadas con ácido alfa-2-8-diacetilneuramínico (un ácido siálico), en donde las NP se prepararon usando formulación por nanoprecipitación/precipitación salina y se conjugaron con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos usando química de carbodiimidas. Se midieron el tamaño y el potencial zeta de las NP usando espectroscopía de correlación de fotones y anemometría Doppler por láser, respectivamente (ZetaSizer 3000 HS, Malvern Instruments, Reino Unido); en la Figura (B) se ilustra la microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas liofilizadas, montadas sobre plataformas de aluminio y revestidas con oro. Las nanopartículas se visualizaron usando un microscopio electrónico de barrido. n = 3. Barra de escala = 100 nm.

En la Figura 4 se muestran imágenes, por microscopía de fluorescencia confocal, de células Raw 264 incubadas con (A) una suspensión de 25 µl de NP desnudas y cargadas con cumarina 6, y (B) una suspensión de 25 µl de NP cargadas con cumarina 6 y conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos, en donde las células se expusieron a dispersiones de NP a lo largo de un periodo de incubación de 90 min a 37 °C y CO₂ al 5%. Las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo y luego con tampón de HEPES, pH de 8, lo que fue seguido de una incubación de 15 minutos con una dilución 1/200 de una disolución de yoduro de TO-PRO[®]-3 (Invitrogen) y finalmente tres lavados con PBS enfriado con hielo. Se realizaron observaciones usando microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania) (verde: NP cargadas con cumarina 6) (azul: tinción del núcleo con topo3). Las flechas blancas resaltan nanopartículas marcadas en verde que se adhieren a las células.

En la Figura 5 se muestran imágenes representativas, por microscopía de fluorescencia confocal, de células Raw 264 incubadas con una suspensión de 50 µl de NP cargadas con rojo Nilo y conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos, en donde las células se expusieron a dispersiones de NP a lo largo de un periodo de incubación de 90 minutos a 37 °C y CO₂ al 5%. Durante los últimos 10 minutos de incubación las células fueron también incubadas con calceína AM (Invitrogen). Las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo y luego con tampón de HEPES, pH de 8, lo que fue seguido de una incubación de 15 minutos con una dilución 1/200 de una disolución de yoduro de TO-PRO[®]-3 (Invitrogen) y finalmente tres lavados con PBS enfriado con hielo. Se realizaron observaciones mediante microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania) (verde: tinción del citoplasma con calceína AM) (rojo: nanopartículas marcadas con rojo Nilo) (azul: tinción del núcleo con topo3). Las flechas blancas resaltan las nanopartículas internalizadas marcadas en rojo.

En la Figura 6 se ilustran imágenes, por microscopía de fluorescencia confocal, de (A) células Raw 264 incubadas con una suspensión de 25 µl de NP cargadas con cumarina 6 y conjugadas con ácido siálico (verde); (B) se preincubaron células Raw 264 durante 3 horas con anticuerpos anti-siglec-E libres y luego se incubaron con nanopartículas cargadas con cumarina 6 y conjugadas con ácido siálico (verde). Se expusieron las células a

dispersiones de NP a lo largo de un periodo de incubación de 90 minutos a 37 °C y CO₂ al 5%. Las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo y luego con tampón de HEPES, pH de 8, lo que fue seguido de una incubación de 15 minutos con una dilución 1/200 de una disolución de yoduro de TO-PRO®-3 (Invitrogen) y finalmente tres lavados con PBS enfriado con hielo. Se realizaron observaciones utilizando microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania) (verde: NP cargadas con cumarina 6) (azul: tinción del núcleo con topo3). Las flechas blancas resaltan nanopartículas marcadas en verde que se unen a las células. Esto muestra que el direccionamiento de nanopartículas-ácido siálico depende de siglec-E.

En la Figura 7 se muestra la suprarregulación de siglec-E (sección superior) a lo largo del tiempo en respuesta a 1 ng/ml de LPS, en donde se estimularon 6x10⁵ macrófagos procedentes de médula ósea murina con 1 ng/ml de LPS durante 0, 3, 6, 12 o 24 horas para suprarregular siglec-E, y las células se lisaron en tampón de Laemmli 2x y se transfirieron con anticuerpo específico anti-siglec-E y un apropiado anticuerpo secundario. En la sección inferior se muestran testigos de carga (gamma-tubulina).

En la Figura 8 se muestra la inhibición diferencial de la respuesta inflamatoria mediante un periodo de incubación con nanopartículas, en donde se estimularon 6x10⁵ macrófagos procedentes de médula ósea murina con 1 ng/ml de LPS durante la noche para suprarregular siglec-E. Las células se lavaron dos veces en medio DMEM exento de suero antes de dejarlas en reposo durante 2 horas. Las células fueron estimuladas de nuevo con 1 ng/ml de LPS ± nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico durante 0, 3, 6, 12 o 24 horas. Se midió el nivel de TNF-α mediante un ensayo ELISA. Se determinó la significación estadística mediante un ensayo ELISA; P = 0,001.

En la Figura 9 se ilustra la reducción de la producción de TNF-α e IL-6 por macrófagos derivados de médula ósea (BMDM; del inglés, bone marrow derived macrophages) C57bl/6 incubados con LPS y nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico. Se estimularon los BMDM con 1 ng/ml de LPS durante la noche para suprarregular siglec-E. Las células se lavaron dos veces en medio DMEM exento de suero antes de dejarlas en reposo durante 2 horas. Las células fueron estimuladas de nuevo con 1 ng/ml de LPS ± nanopartículas (NP) de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico o testigos apropiados: NP no conjugadas (desnudas); NP lavadas con ácido siálico pero no conjugadas; ácido siálico a la misma concentración que las NP; o nanopartículas conjugadas con el no-siglec que se une a glucosamina. Se midieron los niveles de TNF-α e IL-6 mediante un ensayo ELISA. Se empleó un análisis ANOVA de un factor para determinar la significación. P = 0,001 (***) o 0,039 (*) muestra que los BMDM C57bl/6 estimulados con LPS y nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico dan lugar a una respuesta inflamatoria disminuida.

En la Figura 10 se ilustra que las nanopartículas conjugadas con ácido siálico son estables frente a la liofilización, en donde el tratamiento de macrófagos peritoneales C57bl/6 incubados con LPS y nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico reconstituidas da lugar a una respuesta inflamatoria disminuida. Se estimularon 6x10⁵ macrófagos peritoneales C57bl/6 durante 6 horas con 1 ng/ml de LPS ± nanopartículas (NP) de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico reconstituidas o testigos reconstituidos apropiados: NP no conjugadas (desnudas); NP lavadas con ácido siálico pero no conjugadas; ácido siálico a la misma concentración que las NP; o nanopartículas conjugadas con el no-siglec que se une a glucosamina. Se midieron los niveles de TNF-α e IL-6 mediante un ensayo ELISA. Se empleó un análisis ANOVA de un factor para determinar la significación; P = 0,001.

En la Figura 11 se ilustra que la reducción de la respuesta inflamatoria depende de la dosis de conjugación de ácido siálico, en donde macrófagos peritoneales C57bl/6 incubados con LPS y diversas nanopartículas de PLGA conjugadas con diferentes cantidades de ácido α-2,8-siálico dan lugar a una respuesta inflamatoria disminuida que depende de la concentración de ácido siálico unido a las NP. Se estimularon 6x10⁵ macrófagos peritoneales C57bl/6 durante 6 horas con 1 ng/ml de LPS ± nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico (ácido siálico) o testigos reconstituidos apropiados: NP no conjugadas (desnudas) o ácido siálico libre (ácido siálico no conjugado). Se midió el nivel de TNF-α mediante un ensayo ELISA.

En la Figura 12 se ilustra que células THP-1, una línea celular monocítica humana, presentan una degradación de Iκβ reducida cuando son conjuntamente estimuladas con nanopartículas conjugadas con ácido α-2,8-siálico, lo que indica una respuesta proinflamatoria inhibida, en donde se estimularon 1x10⁶ células THP-1 con 100 ng/ml de LPS durante 0, 30, 60 y 90 minutos. Al mismo tiempo también se trataron las células con NP conjugadas con ácido α-2,8-siálico, o con NP no conjugadas. Se lisaron directamente las células en tampón de Laemmli y se transfirieron los lisados celulares completos para Iκβ y gamma-tubulina.

En la Figura 13 se ilustra que el ácido siálico presentado sobre nanopartículas reduce la inflamación *in vivo*, en donde se trataron ratones C57bl/6 con inyecciones peritoneales de LPS (6 mg/kg) y/o 2 mg de una disolución de nanopartículas de PLGA, nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico (ácido siálico), o NP no conjugadas (desnudas), y se utilizó una prueba de chi-cuadrado de rango logarítmico para determinar la significación (N = 8 y P = 0,009).

En la Figura 14 se ilustra que el ácido siálico presentado sobre nanopartículas reduce la inflamación *in vivo*, en donde se trataron ratones C57bl/6 con inyecciones peritoneales de LPS (6 mg/kg) y/o 2 mg de una disolución de nanopartículas de PLGA, nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico (ácido siálico), o NP no conjugadas (desnudas). A t = 24 h, se tomaron muestras de sangre mediante punción en la vena de la cola y se

midieron los niveles de TNF- α e IL-10 a lo largo de 24 horas mediante un ensayo ELISA. Se empleó un análisis ANOVA de un factor para determinar la significación (** = 0,01 y *** = <0,01).

5 En la Figura 15 se ilustra que el ácido siálico presentado sobre nanopartículas puede salvar a ratones de una dosis letal de LPS, en donde se trataron ratones C57bl/6 con inyecciones peritoneales de LPS (6 mg/kg) o PBS y, dos horas más tarde, se inyectaron 2 mg de una disolución de nanopartículas de PLGA, nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico (ácido siálico), o NP no conjugadas (desnudas), por medio de inyecciones peritoneales (n = 4 por sección de estudio).

10 En la Figura 16 se ilustra que se puede utilizar ácido siálico presentado sobre nanopartículas para dirigirse a células leucémicas en una estrategia de direccionamiento de quimioterapia, en donde CPT encapsulado en PLGA muestra una toxicidad mejorada con la incubación de células THP-1 con direccionamiento de 2,8-NANA. Se sembraron células THP-1 durante la noche y luego se incubaron durante 12 horas con: nanopartículas de PLGA cargadas con CPT y desnudas (CPT-NP) o conjugadas con ácido siálico 2,8-NANA (CPT-NANA). Después de la incubación, las células fueron lavadas y fueron incubadas otra vez en nuevo medio celular durante otras 60 horas [los resultados son el valor medio \pm la desviación estándar; n = 6, * (P < 0,05)].

15 Ejemplo 1

Preparación de nanopartículas de PLGA

20 Se disolvieron 20 mg de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) en 200 μ l de DCM y 600 μ l de acetona y luego se inyectó la disolución, bajo agitación moderada, en 3,0 ml de una disolución, enfriada con hielo, que contenía PVA al 2,5% (peso/volumen) y MgCl₂·6H₂O al 45% (peso/volumen) en tampón de MES, pH de 5. Luego se sometieron ambas fases a sonicación a 20 mW en un baño de hielo. Finalmente, se añadieron 5,0 ml adicionales de una disolución de PVA al 2,5% (peso/volumen) en tampón de MES, pH de 5, bajo agitación moderada. Se dejaron las muestras en agitación durante la noche para permitir la evaporación de los disolventes orgánicos. Se separaron las nanopartículas por centrifugación a 85.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y luego se lavaron usando ciclos de suspensión-centrifugación con tampón de MES, pH de 5. Los sedimentos de centrifugación de nanopartículas fueron resuspendidos para obtener una disolución de 5 mg de PLGA/ml en tampón de MES, pH de 5, antes de otro uso.

Ejemplo 2

Activación de nanopartículas y conjugación con ácido siálico

30 La activación de las nanopartículas para permitir la conjugación con el ácido siálico se llevó a cabo añadiendo 200 μ l de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M y 200,0 μ l de N-hidroxisuccinimida (NHS) 0,7 M, ambos disueltos en tampón de MES, pH de 5,0, a la suspensión de nanopartículas, mezcla que se dejó a temperatura ambiental durante 1 hora bajo agitación moderada.

35 Después de una centrifugación para eliminar reactivos adsorbentes no utilizados, se resuspendieron las nanopartículas en PBS en una concentración de 1 mg/ml. Se añadió una disolución de ácido siálico (100 μ l de una disolución de 1,0 mg/ml) a 1 ml de una suspensión de nanopartículas activadas en concentración de 1 mg/ml y se realizó una incubación durante la noche a 4 °C. Finalmente, se centrifugaron las disoluciones a 10.000 x g durante 2 horas a 10 °C y se resuspendieron las nanopartículas en PBS para eliminar el exceso de ácido siálico no conjugado.

40 Se midieron el tamaño de partícula y el potencial zeta de las nanopartículas de PLGA conjugadas o no conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos (un ácido siálico) usando espectroscopía de correlación de fotones y anemometría Doppler por láser, respectivamente (ZetaSizer 3000 HS, Malvern Instruments, Reino Unido), y los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

En los ejemplos proporcionados se discuten además nanopartículas de aproximadamente 150 nm de diámetro y preparadas con 15 μ g de ácido siálico por miligramo de polímero.

Tabla 2

	NP no conjugadas	NP conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos
Tamaño	151 nm \pm 10	152 nm \pm 13
Potencial zeta	0,4 mV \pm 0,4	0,3 mV \pm 0,2

45 Ejemplo 3

La conjugación con ácido siálico facilita el direccionamiento específico a una línea celular mieloide

En la Figura 4 se muestran células Raw 264 incubadas con (A) 25 μ l de una suspensión de nanopartículas desnudas y cargadas con cumarina 6, en una concentración de 100 μ g por mililitro, y (B) 25 μ l de una suspensión de nanopartículas cargadas con cumarina 6 y conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos. Las células se expusieron a las dispersiones de nanopartículas a lo largo de un periodo de incubación de 90 minutos a 37 °C y CO₂ al 5%. Las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo y luego con tampón de HEPES, pH de 8, lo que fue seguido de una incubación de 15 minutos con una dilución 1/200 de una disolución de yoduro de TO-PRO[®]-3 (Invitrogen) y finalmente tres lavados con PBS enfriado con hielo. Se realizaron observaciones utilizando microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania) (verde: NP cargadas con cumarina 6) (azul: tinción del núcleo con topo3). Las flechas blancas resaltan nanopartículas marcadas en verde.

10 Ejemplo 4

Nanopartículas de ácido siálico son internalizadas por células

Como se muestra en la Figura 5, las células fueron expuestas a dispersiones de nanopartículas a lo largo de un periodo de incubación de 90 minutos a 37 °C y CO₂ al 5% y, durante los últimos 10 minutos de incubación, las células fueron también incubadas con calceína AM (Invitrogen). Las células fueron lavadas tres veces con PBS enfriado con hielo y luego con tampón de HEPES, pH de 8, lo que fue seguido de una incubación de 15 minutos con una dilución 1/200 de una disolución de yoduro de TO-PRO[®]-3 (Invitrogen) y finalmente tres lavados con PBS enfriado con hielo. Se realizaron observaciones mediante microscopía confocal de barrido por láser (Leica Confocal TCS Sp2, Alemania) (verde: tinción del citoplasma con calceína AM) (rojo: nanopartículas marcadas con rojo Nilo – se resaltan con flechas las nanopartículas marcadas en rojo) (azul: tinción del núcleo con topo3).

20 Ejemplo 5

Se pueden suprarregular receptores siglec mediante estímulos inflamatorios (LPS)

Como se muestra en la Figura 7, se estimularon 6×10^5 macrófagos procedentes de médula ósea murina con 1 ng/ml de LPS durante 0, 3, 6, 12 o 24 horas para suprarregular siglec-E. Las células se lisaron en tampón de Laemmli 2x y se transfirieron con un anticuerpo específico anti-siglec-E y un apropiado anticuerpo secundario.

25 Ejemplo 6

Nanopartículas de ácido siálico inhiben una respuesta inflamatoria inducida con LPS (expresión de TNF-alfa)

Se estimularon 4×10^4 macrófagos procedentes de médula ósea murina/pocillo con 1 ng/ml de LPS durante la noche para suprarregular siglec-E. Las células se lavaron dos veces en medio DMEM exento de suero antes de dejarlas en reposo durante 2 horas y luego fueron de nuevo estimuladas con 1 ng/ml de LPS \pm 25 μ g/ml de nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico durante 0, 3, 6, 12 o 24 horas, midiéndose el nivel de TNF- α mediante un ensayo ELISA (la significación estadística se determinó mediante un análisis ANOVA de un factor y una prueba de Tukey *post hoc*; P = 0,001) (Figura 5). Se halló que el nivel de TNF-alfa estaba reducido en las células tratadas con nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico.

Ejemplo 7

35 La incubación de BMDM C57bl/6 con 1 ng/ml de LPS y 25 μ g/ml de nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico da lugar a una respuesta inflamatoria disminuida

Se estimularon 4×10^4 macrófagos C57bl/6 procedentes de médula ósea/pocillo con 1 ng/ml de LPS durante la noche para suprarregular siglec-E. Las células se lavaron dos veces en medio DMEM exento de suero antes de dejarlas en reposo durante 2 horas. Se muestran los resultados de células de nuevo estimuladas con 1 ng/ml de LPS \pm nanopartículas (NP) de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico o testigos apropiados: nanopartículas no conjugadas (desnudas); nanopartículas lavadas con ácido siálico pero no conjugadas; ácido siálico a la misma concentración que las nanopartículas; o nanopartículas conjugadas con el no-siglec que se une a glucosamina. Se midieron los niveles de TNF- α e IL-6 mediante un ensayo ELISA. Se empleó un análisis ANOVA de un factor con una prueba de Tukey *post hoc* para determinar la significación; P = 0,001.

45 Se observó que los niveles de TNF-alfa e IL-6 estaban reducidos en las células tratadas con nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α -2,8-siálico.

Esto demuestra que la provisión de nanopartículas o ácido siálico solos es insuficiente para causar el efecto observado y que es la combinación de ácido siálico unido a las nanopartículas lo que da lugar a la reducción de los niveles de TNF-alfa e IL-6.

50 Ejemplo 8

Las nanopartículas conjugadas con ácido siálico son estables frente a la liofilización

Como se muestra en la Figura 10, se estimularon 6×10^5 macrófagos peritoneales C57bl/6 durante 6 horas con 1

5 ng/ml de LPS ± nanopartículas (NP) de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico reconstituidas o apropiados testigos reconstituidos: nanopartículas no conjugadas (desnudas); nanopartículas lavadas con ácido siálico pero no conjugadas; ácido siálico a la misma concentración que las nanopartículas; o nanopartículas conjugadas con el no-siglec que se une a glucosamina. Se midieron los niveles de TNF-α e IL-6 mediante un ensayo ELISA. Se empleó un análisis ANOVA de un factor para determinar la significación; P = 0,001.

Se observó que, incluso después de la liofilización de las nanopartículas conjugadas con ácido siálico, los niveles de TNF-alfa e IL-6 estaban reducidos en las células tratadas con las nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico previamente liofilizadas.

Ejemplo 9

10 Nanopartículas conjugadas con ácido siálico 2,8-enlazado evitan la degradación de IκB en células humanas

En la Figura 12 se muestran 1x10⁶ células THP-1 estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 0, 30, 60 y 90 minutos. Al mismo tiempo también se trataron las células con nanopartículas conjugadas con ácido α-2,8-siálico, o con nanopartículas no conjugadas. Se lisaron directamente las células en tampón de Laemmli y se transfirieron los lisados celulares completos para Iκβ y gamma-tubulina. En las células tratadas con nanopartículas conjugadas con ácido α-2,8-siálico estaba reducida la degradación de IκB (concentración final de 25 μg/ml).

Ejemplo 10

Incubación de células THP-1 con nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico, que contienen camptotecina

20 Se incubaron 4x10⁴ células THP-1 con nanopartículas de PLGA conjugadas con ácido α-2,8-siálico (25 o 50 μg/ml) que contenían 3 μg de camptotecina por miligramo de PLGA y también se llevaron a cabo incubaciones con una disolución de nanopartículas testigo y con nanopartículas no conjugadas.

Como se muestra en la Figura 16, las nanopartículas que incluían camptotecina y a las que se había conjugado ácido α-2,8-siálico causaron la mayor muerte de células de la línea celular de leucemia cuando se realizó la determinación durante 72 horas.

25 **Ejemplo 11**

Estudios *in vivo* que ilustran una respuesta inflamatoria reducida

30 Como se ilustra en la Figura 13, se llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratones, a los que se administraron inyecciones peritoneales de LPS (6 mg/kg) y/o 2 mg de una disolución de nanopartículas de PLGA como las discutidas anteriormente. Aunque los ratones a los que se proporcionaron LPS y nanopartículas desnudas murieron, aquellos que recibieron LPS y nanopartículas que presentaban ácido siálico sobrevivieron. Un análisis de las citocinas séricas (TNF-α e IL-10) a lo largo de 24 horas mostró que las nanopartículas que presentaban ácido siálico reducían los niveles de TNF-α y aumentaban los niveles de IL-10 (véase la Figura 14). Además, se halló que el ácido siálico presentado sobre nanopartículas era capaz de salvar a los ratones de una dosis letal de LPS cuando el ácido siálico presentado sobre nanopartículas se proporcionaba a los ratones hasta 2 horas después de la administración del LPS (véase la Figura 15).

Aunque la invención ha sido particularmente mostrada y descrita con referencia a ejemplos particulares, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar en ella diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria, caracterizado por que el ácido siálico se presenta sobre una nanopartícula o micropartícula, en donde dicha nanopartícula o micropartícula que presenta ácido siálico inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por la célula e induce citocinas antiinflamatorias, en donde el ácido siálico proporcionado es NeuAc α 2-8NeuAc.
2. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria de la Reivindicación 1, en donde la nanopartícula o micropartícula está formada por poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).
- 10 3. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria según la Reivindicación 1, en donde la nanopartícula o micropartícula es un polímero y comprende el ácido siálico en una concentración en el intervalo de 1 ng/mg de ácido siálico a polímero a 1 mg/mg de ácido siálico a polímero.
- 15 4. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria según la Reivindicación 1, en donde la nanopartícula o micropartícula es un polímero y comprende el ácido siálico en una concentración en el intervalo de 10 ng/mg a 100 μ g/mg de ácido siálico a polímero.
- 20 5. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la micropartícula o nanopartícula comprende un agente anticanceroso para uso en el tratamiento de cáncer.
6. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad inflamatoria es leucemia mieloide aguda.
- 25 7. El ácido siálico para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con, o causada por, una respuesta inmune proinflamatoria según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde la enfermedad inflamatoria es enfermedad pulmonar inflamatoria, tuberculosis, trastorno pulmonar obstructivo crónico (COPD), asma, lesión pulmonar aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, fibrosis quística, bronquiectasia, fibrosis pulmonar y otras formas de enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad vascular pulmonar, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, choque séptico, enfermedad cardíaca y vascular, lesiones renales agudas y crónicas, enfermedades cutáneas crónicas y nasales que incluyen dermatitis, estados autoinmunes tales como diabetes, SLE y esclerosis múltiple.
- 30 8. Un método *in vitro* para modular una respuesta inflamatoria en una célula, método que comprende: proporcionar ácido siálico a una célula, en donde el ácido siálico se presenta sobre una nanopartícula o micropartícula de modo que se suprime una respuesta inmune proinflamatoria o se aumenta una respuesta inmune antiinflamatoria en la
- 35 célula, en donde el ácido siálico proporcionado es NeuAc α 2-8NeuAc.

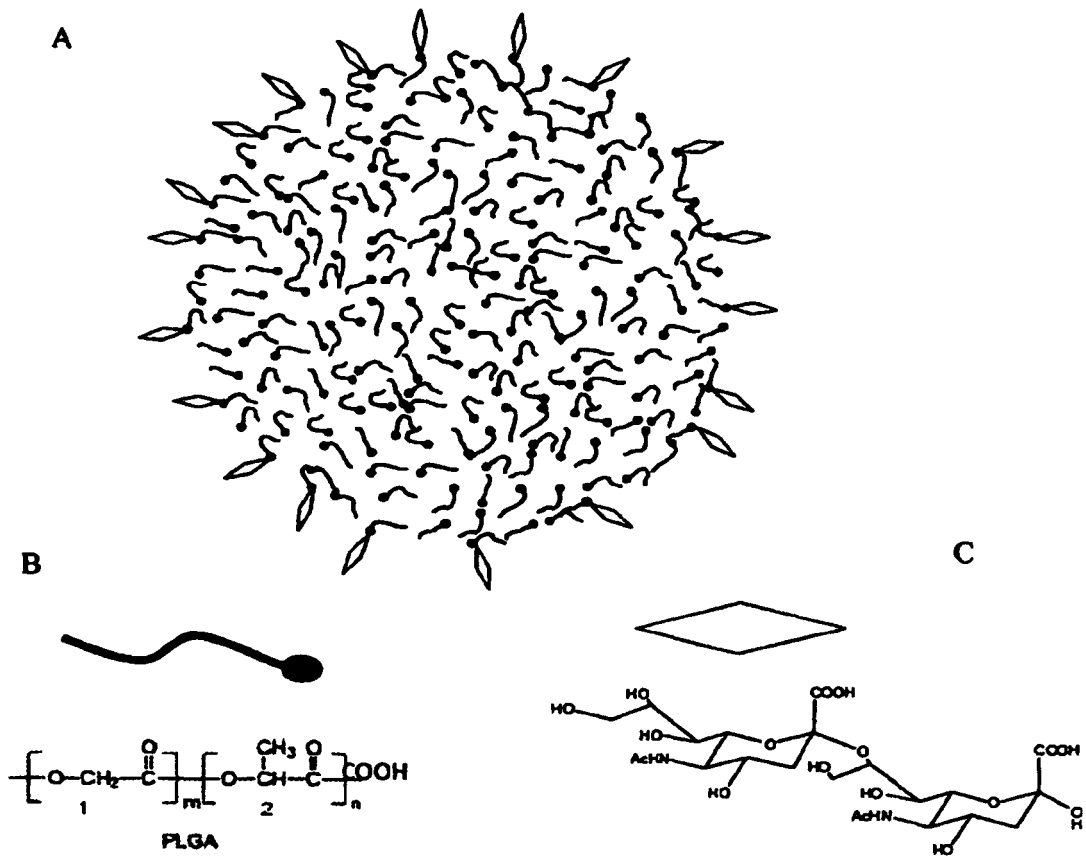


Figura 1

Eficacia de conjugación	Cantidad de ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos conjugados con 1 mg de PLGA
15%	15 $\mu\text{g} \pm 8$

Figura 2

(A)

	NP no conjugadas	NP conjugadas con ácidos alfa-2-8-diacetilneuramínicos
Tamaño	151 nm ± 10	152 nm ± 13
Potencial zeta	0,4 mV ± 0,4	0,3 mV ± 0,2

(B)

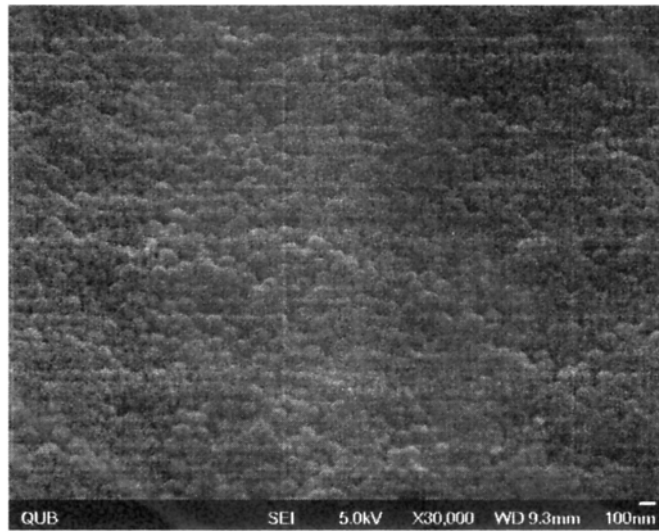


Figura 3

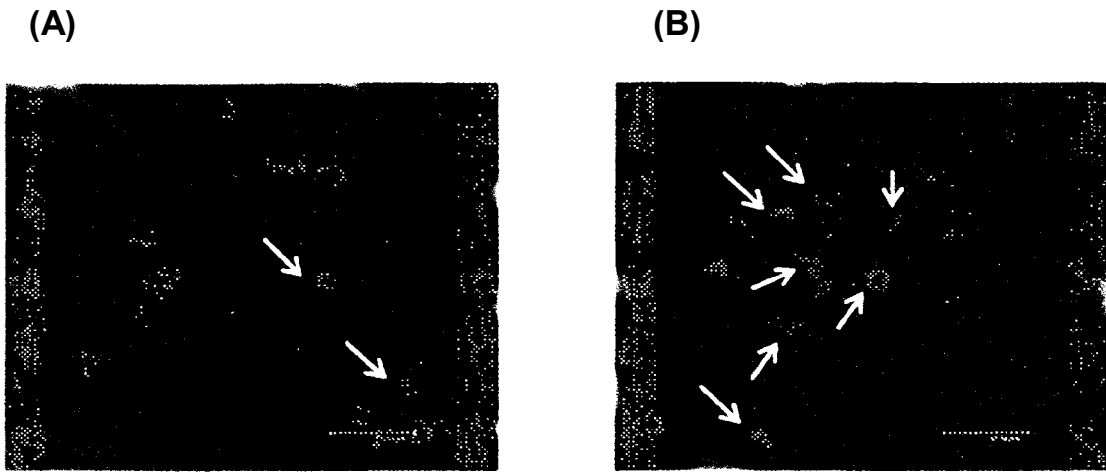


Figura 4

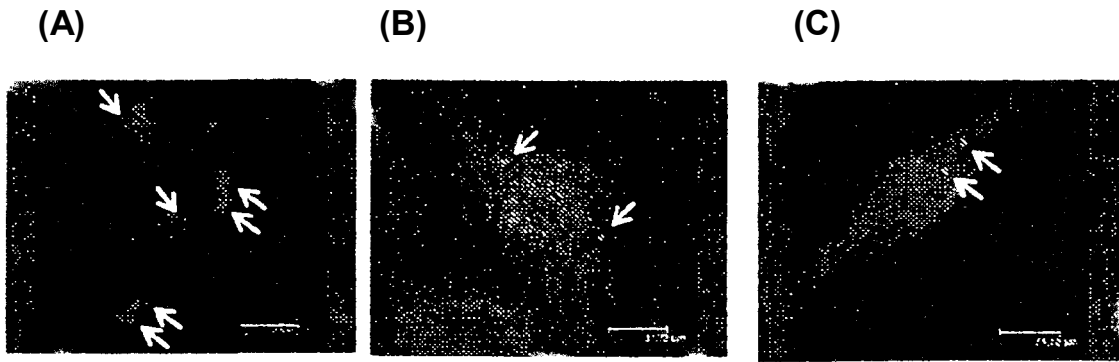


Figura 5

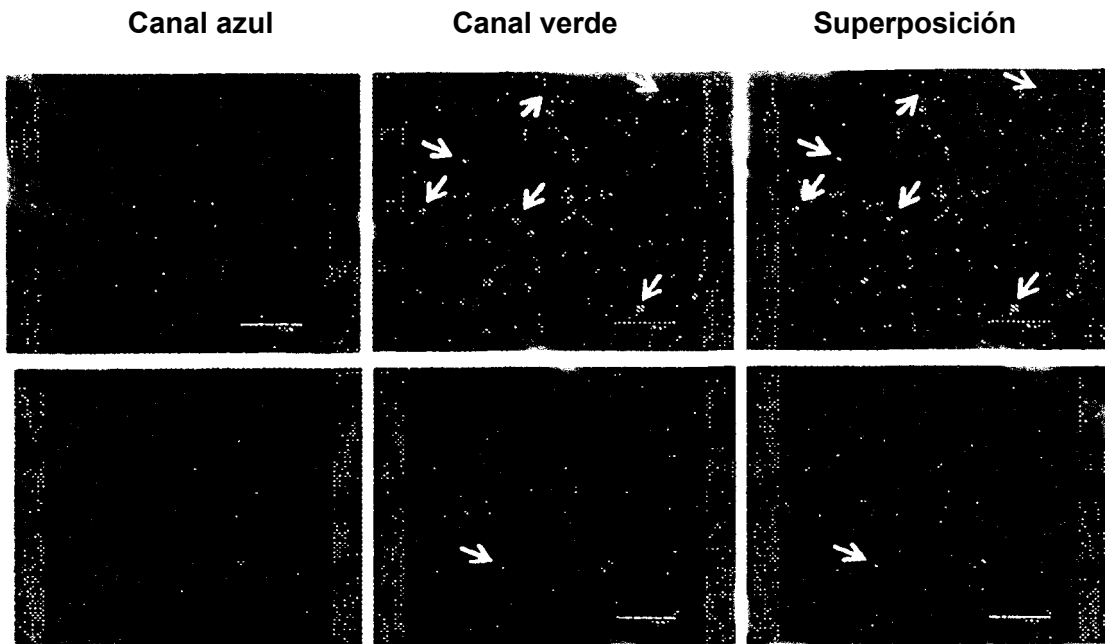


Figura 6

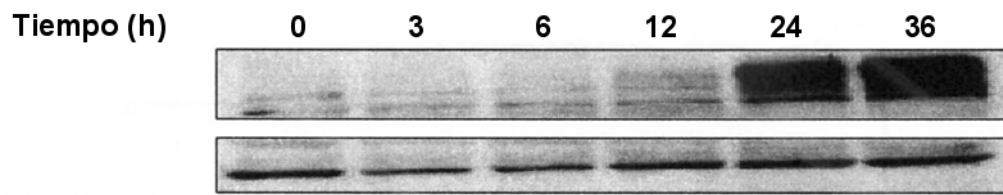


Figura 7

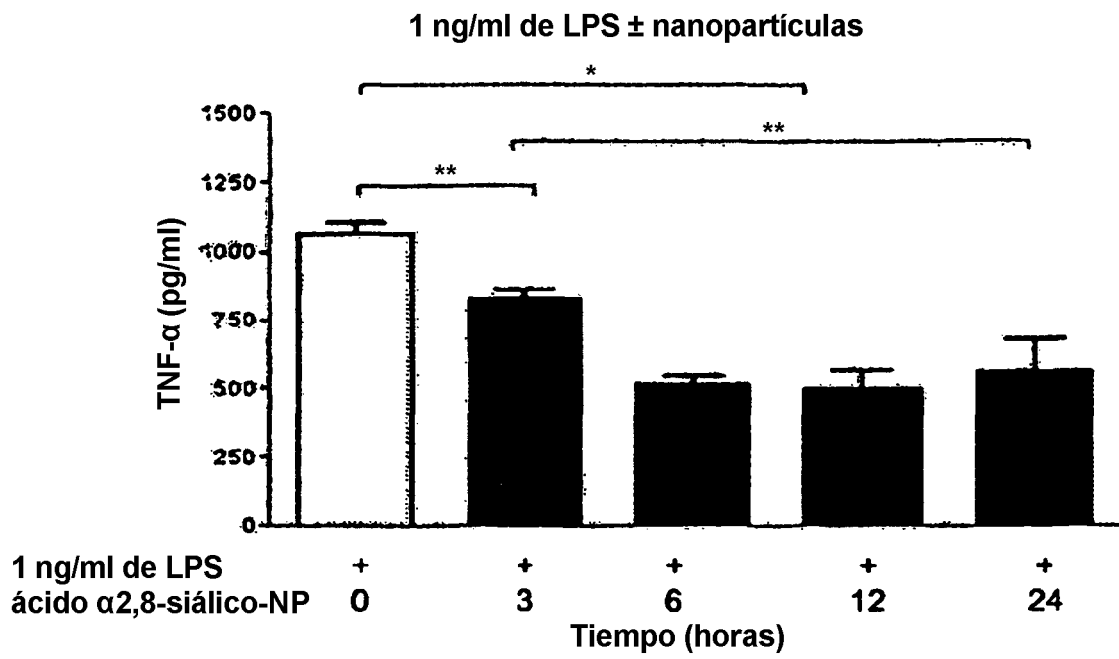


Figura 8

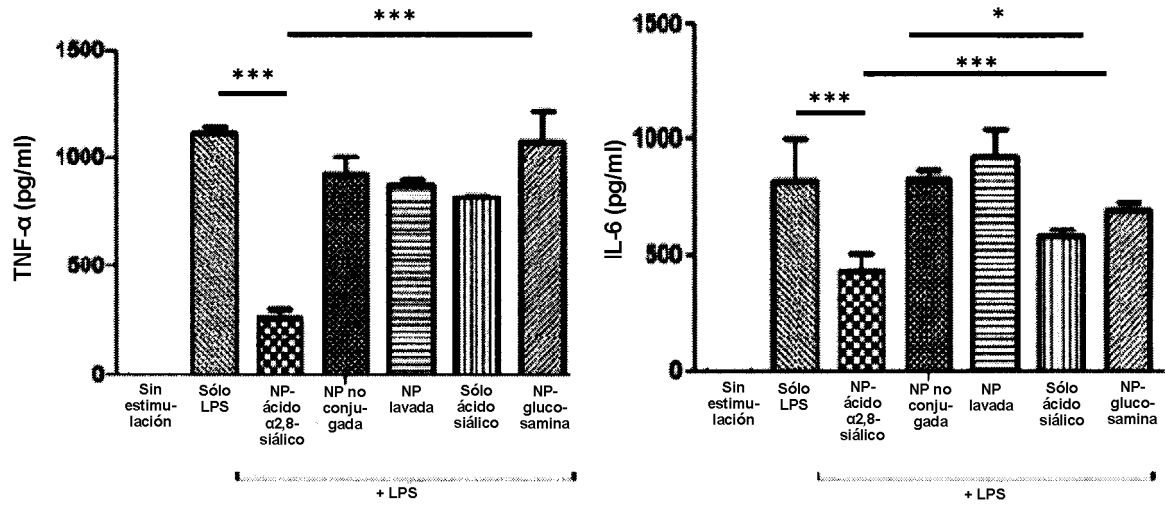


Figura 9

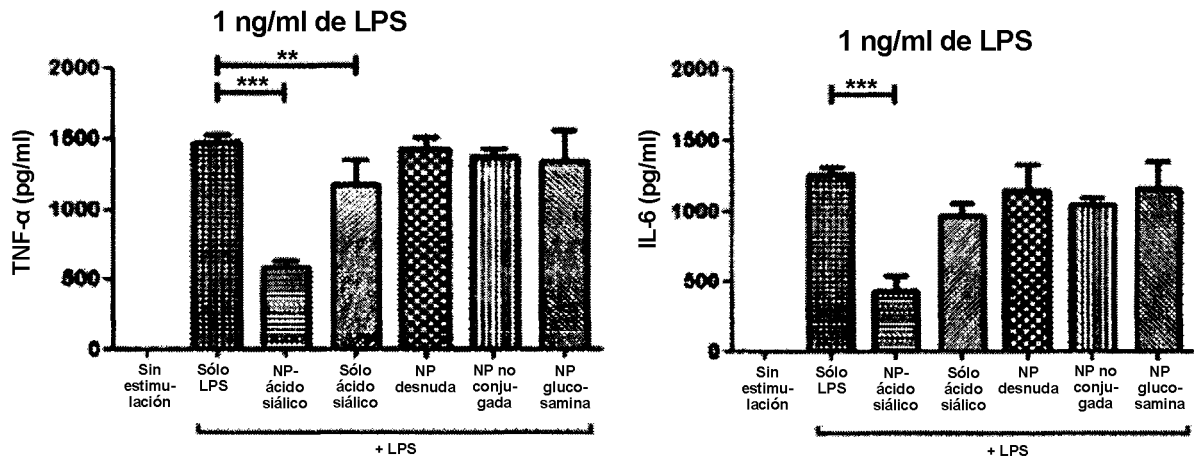


Figura 10

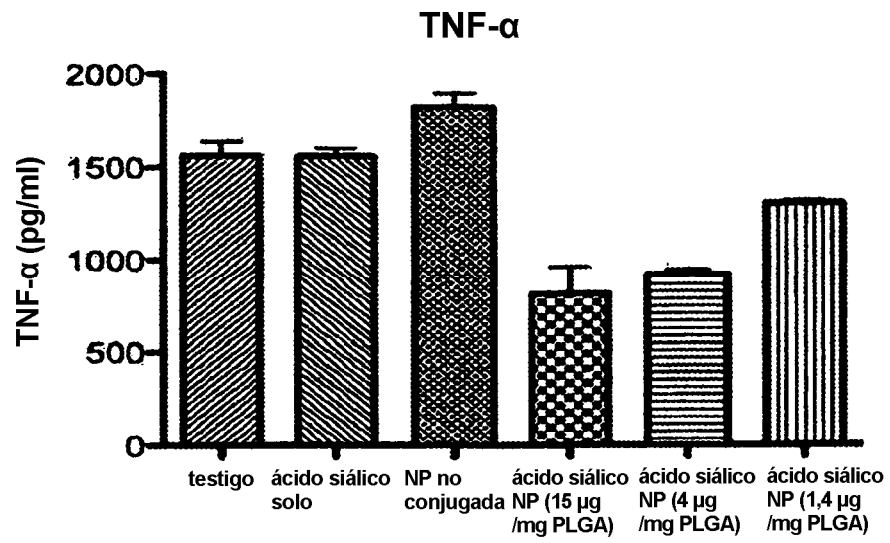


Figura 11

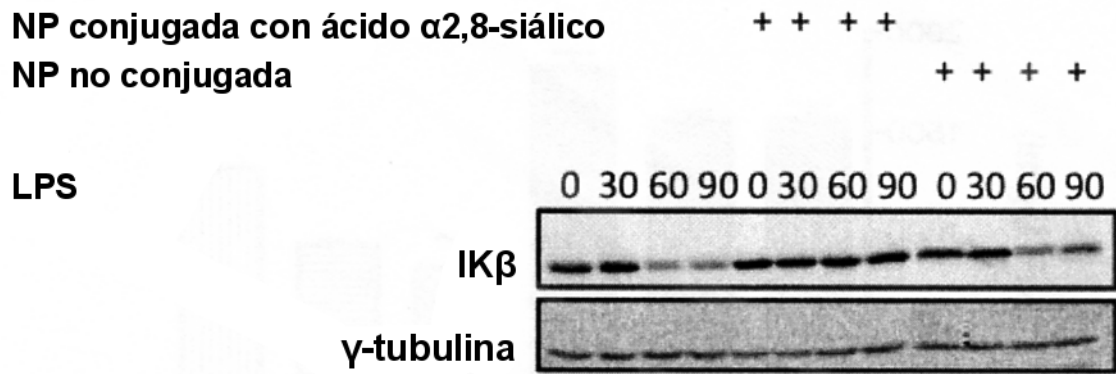


Figura 12

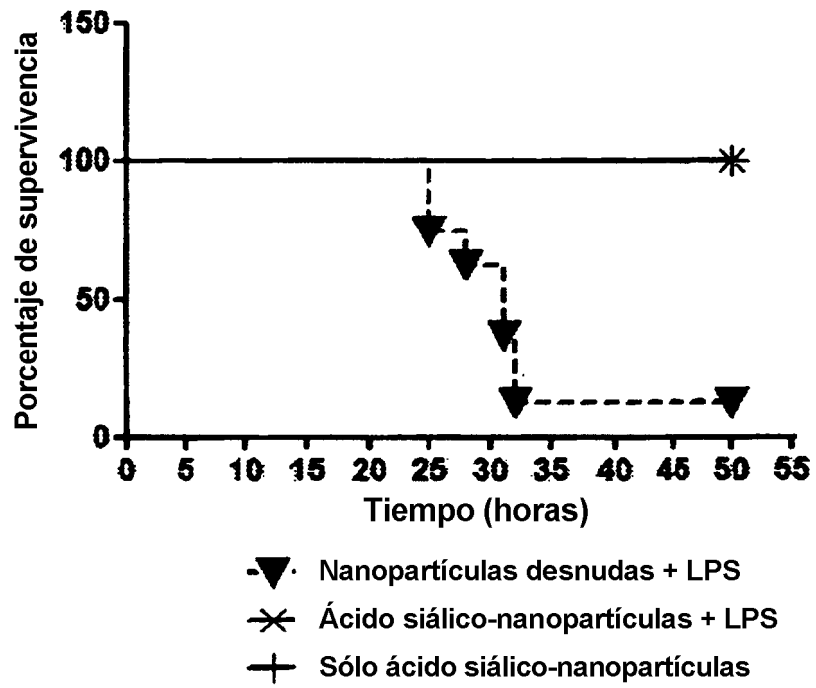


Figura 13

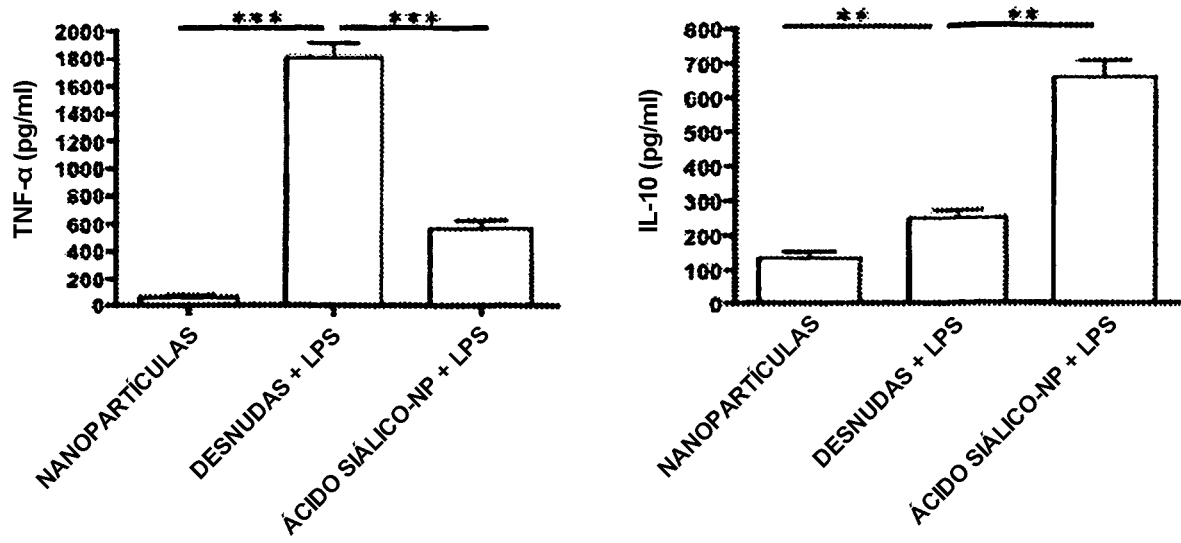


Figura 14

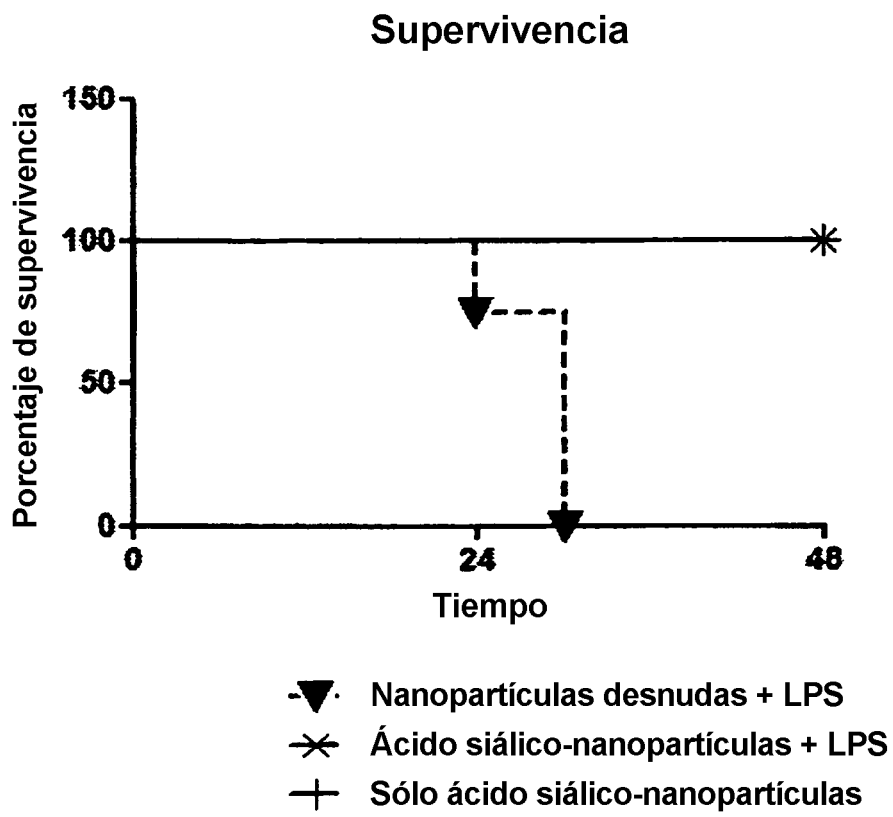


Figura 15

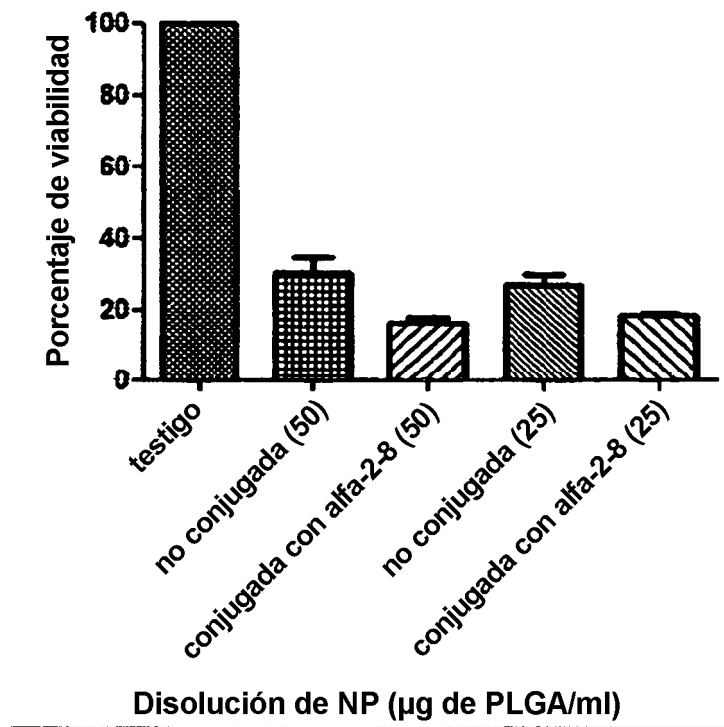


Figura 16