

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 528**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/10** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/032318**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO2013187980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13714425 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2861212**

54 Título: **Nanocería para el tratamiento de estrés oxidativo**

30 Prioridad:

**13.06.2012 US 201261689806 P**

**18.06.2012 US 201261690100 P**

**12.10.2012 US 201261795241 P**

**16.11.2012 US 201261796639 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.06.2017**

73 Titular/es:

**CERION, LLC (100.0%)**

**One Blossom Road**

**Rochester, New York 14610, US**

72 Inventor/es:

**REED, KENNETH, JOSEPH;**

**COSTANZO, WENDI, ANN;**

**ERLICHMAN, JOSEPH, SAMUEL y**

**BELL, ERIC, LESLIE**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**Observaciones :**

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

**ES 2 617 528 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**

Nanocería para el tratamiento de estrés oxidativo

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a mejoras en el campo de la nanomedicina. En particular, la invención se refiere a nanopartículas que contienen cerio preparadas con materiales biocompatibles, a métodos de preparación de tales nanopartículas y al uso de tales nanopartículas para prevenir y para tratar la inflamación y enfermedades y acontecimientos relacionados con estrés oxidativo.

**Antecedentes de la invención**

El estrés oxidativo por radicales libres desempeña un papel principal en la patogenia de muchas enfermedades humanas, y en particular, de enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, el tratamiento con antioxidantes, que puede reducir especies de radicales libres particulares, podría prevenir teóricamente el daño tisular y mejorar tanto la supervivencia como el desenlace neurológico. Los radicales libres en entornos fisiológicos a menudo pueden clasificarse o bien como especies reactivas del oxígeno (ROS) o bien como especies reactivas del nitrógeno (RNS). Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas y reaccionan fácilmente con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos a nivel subcelular y contribuyen de ese modo a la progresión de diversas enfermedades.

El origen del uso de nanocería en nanomedicina puede seguirse hasta el trabajo fundamental de Bailey y Rzigalinski, en el que se observó que la aplicación de partículas ultrafinas de óxido de cerio a células de cerebro en cultivo aumentaba enormemente la capacidad de supervivencia de las células, tal como describe Rzigalinski en *Nanoparticles and Cell Longevity, Technology in Cancer Research & Treatment* 4(6), 651-659 (2005). Más particularmente, se mostró que cultivos de células de cerebro de rata *in vitro* sobrevivían aproximadamente 3-4 veces más cuando se trataban con nanopartículas de óxido de cerio de 2-10 nanómetros (nm) de tamaño sintetizadas mediante una técnica de microemulsión de micelas invertidas, tal como notifica Rzigalinski *et al.* en la patente estadounidense 7.534.453, presentada el 4 de septiembre de 2003. Las nanopartículas de óxido de cerio proporcionaron una protección considerable a células de cerebro en cultivo expuestas a una dosis letal de radicales libres generados por peróxido de hidrógeno o exposiciones a luz ultravioleta. Además, se notificó que las nanopartículas de óxido de cerio eran relativamente inertes en el cuerpo murino, con baja toxicidad (por ejemplo, inyecciones en la vena de la cola no produjeron efectos tóxicos). Aunque no se notificaron beneficios médicos *in vivo*, se postularon beneficios para tratamientos con estas nanopartículas de ceria, incluyendo inflamación reducida asociada con heridas, implantes, artritis, enfermedad articular, enfermedad vascular, envejecimiento tisular, accidente cerebrovascular y lesión cerebral por traumatismo.

Sin embargo, Rzigalinski *et al.* notificaron posteriormente un conjunto de problemas con estas partículas de nanocería particulares en el documento WO 2007/002662. La nanocería producida mediante esta técnica de microemulsión de micelas invertidas adolecía de varios problemas: (1) el tamaño de partícula no estaba bien controlado dentro del intervalo notificado de 2-10 nanómetros (nm), haciendo que la variabilidad entre lotes sea alta; (2) efecto de cola (contaminación remanente) de tensioactivos, tales como bis(etilhexil)sulfosuccinato de sodio, también conocido como docusato sódico o (AOT), usados en el procedimiento para obtener el producto final, producían respuestas tóxicas; (3) la incapacidad para controlar la cantidad de efecto de cola de tensioactivos planteaba problemas con la aglomeración cuando estas nanopartículas se colocaban en medios biológicos, dando como resultado eficacia y capacidad de administración reducidas; y (4) la inestabilidad del estado de valencia del cerio (+3/+4) a lo largo del tiempo. Por tanto, las nanopartículas de óxido de cerio producidas mediante la técnica de microemulsión de micelas invertidas eran altamente variables de un lote a otro, y mostraban una toxicidad mayor de la deseada para células de mamífero.

Como alternativa, Rzigalinski *et al.* en el documento WO 2007/002662 notificaron la eficacia biológica de la nanocería sintetizada mediante técnicas a alta temperatura, obtenida a partir de al menos tres fuentes comerciales. Se notificó que estas nuevas fuentes de nanopartículas de óxido de cerio proporcionaban reproducibilidad superior de la actividad de un lote a otro. Se notificó además que, independientemente de la fuente, las partículas de óxido de cerio que tenían un tamaño pequeño, distribución de tamaño estrecha y baja tasa de aglomeración son las más ventajosas. En cuanto al tamaño, esta divulgación afirma específicamente que en realizaciones en las que se introducen partículas en el interior de las células, el intervalo de tamaño preferible de las partículas que se introducen en la célula es de desde aproximadamente 11 nm hasta aproximadamente 50 nm, tal como aproximadamente 20 nm. En realizaciones en las que las partículas ejercen sus efectos sobre las células desde fuera de las células, el intervalo de tamaño preferible de estas partículas extracelulares es de desde aproximadamente 11 nm hasta aproximadamente 500 nm.

Rzigalinski *et al.* también notifican que para su administración, las nanopartículas estaban en una forma ventajosamente no aglomerada. Para lograr esto, notificaron que podrían sonicarse disoluciones madre de aproximadamente el 10% en peso en agua de pureza ultraalta o en solución salina normal preparadas con agua de pureza ultraalta. Sin embargo, como han indicado otros, las dispersiones acuosas sonicadas de nanocería

sintetizada mediante técnicas a alta temperatura (por ejemplo, obtenida a partir de fuentes comerciales) es altamente inestable y sedimenta rápidamente (es decir en el plazo de minutos), produciendo variabilidad sustancial en la administración de dispersiones acuosas de nanocería derivadas de estas fuentes. Rzigalinski *et al.* notifican eficacia biológica en sistemas modelo relativamente sencillos, incluyendo cultivos celulares *in vitro*, moscas de la fruta *Drosophila melanogaster* alimentadas por vía oral, y en ratones a los que se inyectó en la vena de la cola una dosis aparentemente menor que la terapéutica (300 nanomoles o aproximadamente 0,2 mg/kg).

Yokel *et al.* en *Nanotoxicology*, 2009, 3(3): 234-248, describen un amplio estudio de los efectos del estrés oxidativo y la biodistribución de un nanomaterial de ceria comercial. En particular, se sonicó una dispersión de nanocería al 5% obtenida de Aldrich (n.º 639648) durante 3 minutos y se infundió en ratas a una dosis de 50, 250 y 750 mg/kg de nanocería. Se desconocía la naturaleza de cualquier estabilizador(es) de la superficie de nanopartículas para este material. El tamaño de las partículas de nanocería se caracterizó mediante una variedad de técnicas y se notificó que era como promedio 31 +/- 4 nm mediante dispersión dinámica de luz. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló que la mayoría de las partículas eran plaquetas con una distribución de tamaño bimodal con picos a los 8 nm y a los 24 nm, junto con algunas partículas de ~100 nm. Se observó que la sangre incubada durante 1 hora con esta forma de nanocería tenía aglomerados que oscilaban entre ~200 nm y más de 1 micrómetro, y que cuando se infundía en ratas, se eliminaba rápidamente de la sangre (semivida de 7,5 minutos). Se observó que la mayor parte de la nanocería se acumulaba en el hígado y el bazo, mientras que no estaba claro si alguna cantidad sustancial había penetrado a través de la barrera hematoencefálica y había entrado en las células del tejido cerebral.

Yokel *et al.* buscaron entonces el control preciso sobre el recubrimiento en superficie de nanocería (estabilizador) y prepararon dispersiones acuosas estables de nanocería mediante la preparación hidrotérmica en dos etapas directa de Masui *et al.*, *J. Mater. Sci. Lett.* 21, 489-491 (2002), que incluyó citrato de sodio como estabilizador biocompatible. La TEM de alta resolución reveló que esta forma de nanocería poseía morfología de partícula poliédrica cristalina con bordes afilados y distribución de tamaño estrecha de 4-6 nm. Se notificó que dispersiones estabilizadas de citrato de estas nanopartículas de ceria de 5 nm de tamaño promedio eran estables durante más de 2 meses a un pH fisiológico de 7,35 y un potencial zeta de -53 mV. Por tanto no se requirió sonicación antes de la administración.

Hardas *et al.*, *Toxicological Sciences* 116(2), 562-576 (2010) notificaron los resultados de un amplio estudio de biodistribución y toxicología de esta forma de nanocería estabilizada con citrato. Sorprendentemente, notificaron que en comparación con la nanocería de ~ 30 nm estudiada previamente (Aldrich (n.º 639648), descrito anteriormente), esta nanocería más pequeña era más tóxica, no se observaba en el cerebro y producía poco efecto sobre el estrés oxidativo en el hipocampo y el cerebelo. Los resultados eran contrarios a la hipótesis de que el nanomaterial obtenido mediante ingeniería más pequeño permearía fácilmente en la barrera hematoencefálica.

Aunque pueden prepararse nanopartículas que contienen óxido de cerio mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, las partículas normalmente requieren un estabilizador para prevenir la aglomeración no deseada. En cuanto a los estabilizadores de nanocería biocompatibles usados anteriormente, Masui *et al.*, *J. Mater. Sci. Lett.* 21, 489-491 (2002) describen un procedimiento hidrotérmico de dos etapas que produce directamente dispersiones acuosas estables de nanopartículas de ceria que usa tampón citrato como estabilizador. Sin embargo, este procedimiento lleva mucho tiempo y utiliza mucho equipo, requiriendo dos etapas de reacción separadas 24 horas en reactores cerrados pesados.

Sandford *et al.*, documento WO 2008/002323 A2, notifican una técnica de preparación acuosa usando un estabilizador biocompatible (ácido acético) que produce directamente dispersiones de nanopartículas de dióxido de cerio sin una etapa de precipitación o aislamiento, y sin calcinación posterior. El ion ceroso se oxida lentamente a ion cérico mediante el ión nitrato, y se obtiene un sol no aglomerado estable de tamaño de cristalita de 11 nm (y tamaño de grano aproximadamente igual) cuando se usa ácido acético como estabilizador.

DiFrancesco *et al.* en el documento PCT/US2007/077545, METHOD OF PREPARING CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES, presentado el 4 de septiembre de 2007, describen la oxidación del ion ceroso mediante peróxido de hidrógeno a pH bajo (< 4,5) en presencia de estabilizadores biocompatibles, tales como ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), y combinaciones de los mismos. Específicamente, se muestra que el estabilizador ácido láctico y la combinación de ácido láctico y EDTA producen directamente dispersiones de nanocería estables (tamaño de partícula promedio en el intervalo de 3-8 nm), sin una etapa intermedia de aislamiento de partícula.

Karakoti *et al.* en *J. Phys. Chem. C* 111, 17232-17240 (2007) notifican una síntesis directa de nanocería en mono/polisacáridos mediante la oxidación de ion ceroso tanto en condiciones ácidas (mediante peróxido de hidrógeno) como en condiciones básicas (mediante hidróxido de amonio). Los estabilizadores biocompatibles específicos dados a conocer incluyen glucosa y dextrano. Se dan a conocer tamaños de partícula individuales de tan solo 3-5 nm, sin embargo, resultan aglomerados débiles de 10-30 nm. Aunque no se describe la fuente de inestabilidad coloidal, se cree que la magnitud del potencial zeta de estas partículas puede no haber sido suficientemente grande.

Karakoti *et al.* en *JOM (Journal of the Minerals, Metals & Materials Society)* 60(3), 33-37 (2008) comentan el reto de

5 sintetizar dispersiones estables de nanoceria en medios biológicamente relevantes, para que sean compatibles con la fisiología del organismo, que requiere una comprensión de química coloidal (potencial zeta, tamaño de partícula, dispersante, pH de la disolución, etc.) para no interferir con la capacidad de reducción/oxidación (redox) de la nanoceria lo que permite la eliminación de radicales libres (especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno). Karakoti *et al.* describen específicamente la oxidación de nitrato de cerio mediante peróxido de hidrógeno a bajo pH (< 3,5) en ausencia de cualquier estabilizador, así como en presencia de estabilizadores de dextrano, etilenglicol y polietilenglicol (PEG). Se notifican tamaños de partícula de 3-5 nm, aunque también se notifica aglomeración de partículas hasta 10-20 nm.

10 Kim *et al.* en Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 1-6 notifican que nanoceria de 3 nm sintetizada mediante un método de micelas inversas y encapsulada con fosfolípido-polietilenglicol (PEG) puede proteger contra accidente cerebrovascular isquémico en ratas reduciendo el volumen de infarto cerebral y eliminando ROS. Sin embargo, dosis mayores no protegen y se cree que esto puede estar relacionado con problemas de efecto de cola de tensioactivos, tal como se indicó anteriormente, que afecta al método de síntesis de micelas invertidas.

15 Sigue habiendo una necesidad de métodos y agentes eficaces y efectivos para mediar y mejorar el daño producido por estrés oxidativo por radicales libres. Además, sigue habiendo una necesidad de mejoras adicionales en métodos para la preparación directa (es decir sin una etapa de aislamiento de partículas) de dispersiones biocompatibles de nanopartículas que contienen cerio, por ejemplo, con mayor rendimiento, en un periodo de tiempo más corto y con densidades de suspensión mayores, que sean de tamaño suficientemente pequeño, que puedan penetrar a través de una barrera hematoencefálica sana o no sana, de distribución de frecuencia de tamaño más uniforme, estables y no tóxicas en una amplia variedad de medios biológicos, con captación celular y tiempo de circulación vascular aumentados *in vivo*. Adicionalmente, sería bastante útil producir medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación y acontecimientos relacionados con estrés oxidativo, tales como accidente cerebrovascular isquémico y lesión por reperfusión, y enfermedades relacionadas con estrés oxidativo, en particular, enfermedades del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica, en mamíferos, y particularmente en seres humanos.

### 30 Sumario de la invención

Según un aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de una dispersión de nanopartículas, que comprende: formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido cítrico (AC) y ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) en una razón molar (AC/EDTA) que oscila entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 0,1 (es decir desde aproximadamente 3:1 hasta aproximadamente 1:9), un oxidante, y agua; opcionalmente, calentar o enfriar la mezcla de reacción, y formar directamente, sin aislamiento, una dispersión de nanopartículas que contienen cerio.

40 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de prevención (es decir de tratamiento profiláctico) de una enfermedad relacionada con estrés oxidativo, y en particular, una enfermedad del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica, que comprende administrar, antes de la aparición de una enfermedad relacionada con estrés oxidativo, una cantidad eficaz de una nanopartícula que contiene cerio preparada en presencia de una mezcla de ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético en una razón molar que oscila entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 0,1.

45 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o acontecimiento relacionado con estrés oxidativo, y en particular, una enfermedad del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica, que comprende administrar, tras la aparición de una enfermedad o acontecimiento, una cantidad eficaz de nanopartículas que contienen cerio preparadas en presencia de una mezcla de ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético en una razón molar que oscila entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 0,1.

50 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético, en la que la razón molar de ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético añadidos durante la preparación está en un intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 0,1.

55 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético, en la que la razón molar de ácido cítrico con respecto a ácido etilendiaminatetraacético oscila entre oscila entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 0,1.

60 En un sexto aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o acontecimiento relacionado con estrés oxidativo, que comprende una nanopartícula de óxido de cerio, en la que la razón molar de ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético añadidos durante la preparación está en un intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 0,1.

65 En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con estrés oxidativo, que comprende una nanopartícula de óxido de

cerio que puede penetrar a través de la barrera hematoencefálica de un mamífero.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 contiene espectros de difracción de rayos X de polvo (XRD) de nanopartículas de ceria con AC/EDTA junto con el espectro de líneas de CeO<sub>2</sub> (cerianita).
- La figura 2 es una micrografía de TEM de nanopartículas de ceria con AC/EDTA secadas.
- 10 La figura 3 es una micrografía de TEM de alta resolución de nanopartículas de ceria con AC/EDTA secadas.
- La figura 4 es un diagrama de distribución por clase de tamaño de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA.
- 15 La figura 5 es un gráfico de la puntuación clínica media en función del tiempo para el modelo crónico-progresivo de EM para el control con vehículo y para CeNP administradas en los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 10 mg/kg.
- La figura 6 es un gráfico de la puntuación clínica media en función del tiempo en el modelo crónico-progresivo de EM para el control con vehículo, régimen de tratamiento preventivo y terapéutico. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 20 mg/kg.
- 20 La figura 7 es un diagrama de puntuación clínica (AUC) a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo crónico-progresivo de EM para el control con vehículo (cont) y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo (prev) y terapéutico (ter). La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 20 mg/kg.
- 25 La figura 8 es un diagrama de la gravedad clínica (AUC) del modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP para el régimen de tratamiento preventivo.
- 30 La figura 9 es un diagrama de la gravedad clínica (AUC) del modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP para el régimen de tratamiento terapéutico (después de 3 días).
- La figura 10 es un gráfico de la reducción en la gravedad de la enfermedad en función de la ceria total (CeNP) inyectada en el modelo crónico-progresivo de EM.
- 35 La figura 11 es un gráfico del contenido en cerio del cerebro en función de la ceria total (CeNP) inyectada en el modelo crónico-progresivo de EM.
- La figura 12 es un gráfico de la puntuación clínica media en función del tiempo para el modelo crónico-progresivo de EM para el control, para CeNP administradas en los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico, y para tratamientos con fingolimod diario. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 30 mg/kg.
- 40 La figura 13 es un diagrama de la disminución en la gravedad de la enfermedad durante la fase aguda (días 0-30) del modelo crónico-progresivo de EM, en relación con los controles, para fingolimod, y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico (después de 7 días).
- 45 La figura 14 es un diagrama de la disminución en la gravedad de la enfermedad durante la fase crónica (días 31-35) del modelo crónico-progresivo de EM, en relación con los controles, para fingolimod y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico (después de 7 días).
- 50 La figura 15 es un diagrama que evalúa la gravedad de la enfermedad (AUC) durante todo el curso de la enfermedad para el modelo crónico-progresivo de EM para el control, para CeNP administradas mediante los regímenes preventivo (prev) y terapéutico (después de 7 días) (ter) y para el régimen de tratamiento diario con fingolimod (fing).
- 55 La figura 16 es un gráfico del rendimiento en la prueba de barra giratoria (*rotarod*) en función del tiempo para el modelo crónico-progresivo de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 20 mg/kg.
- 60 La figura 17 es un diagrama del rendimiento en la prueba de barra giratoria para el modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP administradas mediante el régimen de tratamiento preventivo.
- La figura 18 es un diagrama del rendimiento en la prueba de barra giratoria para el modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP administradas mediante el régimen de tratamiento terapéutico (después de 3 días).
- 65

La figura 19 es un gráfico del rendimiento en la prueba de varilla colgante (*hanging wire test*) en función del tiempo para el modelo crónico-progresivo de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 20 mg/kg.

5 La figura 20 es un diagrama del rendimiento en varilla colgante para el modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico (retardado).

10 La figura 21 es un gráfico del rendimiento en la prueba de barra de equilibrio en función del tiempo para el modelo crónico-progresivo de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico. La dosificación del tratamiento con fármaco (CeNP) fue de 20 mg/kg.

15 La figura 22 es un diagrama del rendimiento en la prueba de barra de equilibrio para el modelo crónico-progresivo de EM en función de la dosificación de CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico (retardado).

20 La figura 23 es un diagrama de la ceria total acumulada en el cerebro y la médula espinal (me) y en tejidos de cerebelo aislados tomados de ratones C57BL/6 a los que se ha inducido EM crónica-progresiva y a los que se ha administrado control con vehículo (cont) o 20 mg/kg de CeNP en los regímenes de tratamiento preventivo (prev) y terapéutico (ter).

25 La figura 24 es un diagrama de los resultados de ICP-EM para la acumulación de ceria en diversos tejidos tomados de ratones C57BL/6 a los que se ha inducido EM crónica-progresiva y a los que se ha administrado 20 mg/kg de CeNP en los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico y a los que se sacrificó el día 42 tras la inducción de la enfermedad.

30 La figura 25 es un diagrama del nivel de especies reactivas del oxígeno (intensidad luminosa) en el cerebro (secciones del cerebelo) durante la fase crónica (día 42) de EM crónica-progresiva para ratones C57BL/6 tratados con control con vehículo, fingolimod y ceria (CeNP) administrados mediante el régimen de tratamiento preventivo (dosificación de 30 mg/kg).

35 La figura 26 es un diagrama del nivel de especies reactivas del oxígeno (intensidad luminosa) en el cerebro (secciones de cerebelo) durante la fase crónica (día 42) del modelo crónico-progresivo de EM expresado como un porcentaje del control para fingolimod y CeNP administrados mediante los regímenes de tratamiento preventivo (dosificación de 30 mg/kg).

40 La figura 27 contiene imágenes de microscopía de fluorescencia de cortes cerebrales de cerebelo tratados con el colorante indicador de radicales libres CM-DCFDA tomadas el día 42 de ratones tratados con ceria (CeNP) (régimen de tratamiento preventivo) y control sin tratar (imágenes seudocoloreadas de manera que la intensidad de fluorescencia mayor aparece como un color más cálido (por ejemplo rojo/naranja, zonas más claras) y la intensidad menor aparece como un color más frío (por ejemplo azul/violeta, zonas más oscuras).

45 La figura 28 contiene imágenes de microscopía de cortes cerebrales de cerebelo de ratón tratados con tinción inmunohistoquímica.

La figura 29 es un gráfico de la puntuación clínica media en función del tiempo para el modelo de recaída/remisión de EM para el control con vehículo y para CeNP administradas en los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico.

50 La figura 30 es un gráfico del rendimiento en la prueba de barra de equilibrio en función del tiempo para el modelo de recaída/remisión de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico.

55 La figura 31 es un gráfico del rendimiento en la prueba de varilla colgante en función del tiempo para el modelo de recaída/remisión de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico.

60 La figura 32 es un gráfico de rendimiento en la prueba de barra giratoria en función del tiempo para el modelo de recaída/remisión de EM para el control y para CeNP administradas mediante los regímenes de tratamiento preventivo y terapéutico.

65 La figura 33 es un diagrama de puntuaciones clínicas (AUC) a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM para el control, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) y para nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) administradas mediante el régimen de tratamiento terapéutico.

La figura 34 es un diagrama de la puntuación promedio en barra de equilibrio a lo largo del curso de la enfermedad

para el modelo de recaída/remisión de EM para el control, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) y para nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) administradas mediante el régimen de tratamiento terapéutico.

5 La figura 35 es un diagrama del rendimiento promedio en la prueba de varilla colgante lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM para el control, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) y para nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) administradas mediante el régimen de tratamiento terapéutico.

10 La figura 36 es un diagrama del rendimiento promedio en la prueba de barra giratoria a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM para el control, Sigma-Aldrich, Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) y para nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) administradas mediante el régimen de tratamiento terapéutico.

15 La figura 37 es un diagrama de resultados de deposición en cerebro para el modelo de recaída/remisión de EM dosificado mediante el régimen de tratamiento terapéutico con nanopartículas de ceria con AC/EDTA (etiquetadas CNRx) en comparación con diversas nanocerias disponibles comercialmente (dosificación total de 24 mg/kg).

20 La figura 38 es un diagrama del contenido de ceria en el cerebro en función del tiempo tras la inyección final de nanopartículas de ceria con AC/EDTA en el modelo de recaída/remisión de EM (dosificación total de 24 mg/kg).

La figura 39 es un gráfico de la concentración de ceria en el plasma sanguíneo a lo largo de un periodo de 24 horas para una inyección intravenosa (i.v.) de 10 mg/kg (IV) y para una inyección subcutánea de 50 mg/kg de CeNP en ratas.

25 La figura 40 es un diagrama del intervalo de supervivencia (días) para ratones con ELA modelo G93A tratados con control con vehículo y CeNP (CNRx 87).

30 La figura 41 es un diagrama de la acumulación de LDH tras isquemia/reperfusión miocárdica a través del procedimiento de corazón aislado de Langendorff para ratones tratados con control con vehículo y con CeNP (CNRx 87) dosificados con 20 mg/kg en los días -4, -2 y 0.

### Descripción detallada de la invención

35 Ha de entenderse que los elementos no mostrados o descritos específicamente pueden adoptar diversas formas bien conocidas por los expertos en la técnica. La invención se define por las reivindicaciones.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término nanopartícula incluye partículas que tienen un diámetro medio menor de 100 nm. Para los fines de esta divulgación, a menos que se establezca de otro modo, el diámetro de una nanopartícula se refiere a su diámetro hidrodinámico, que es el diámetro determinado mediante la técnica dispersión dinámica de luz e incluye adsorbatos moleculares y la cubierta de solvatación adjunta de la partícula. Alternativamente, el diámetro geométrico de la partícula puede estimarse mediante análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM).

45 Tal como se usa en el presente documento, diversos materiales que contienen cerio se describen de manera intercambiable como "ceria", "óxido de cerio" o "dióxido de cerio." Un experto en la técnica química entenderá que los aniones oxídicos reales presentes en estos materiales pueden comprender aniones de óxido o aniones de hidróxido, o mezclas de los mismos, tales como fases de óxido hidratado (por ejemplo oxihidróxido). Además, se sabe que las composiciones de materia pueden componerse de disoluciones sólidas de cationes multivalentes y se denominan sólidos no estequiométricos. Por tanto, para fases de óxido que se componen de cationes metálicos de múltiples estados de oxidación, se entiende que la cantidad total de aniones oxídicos presentes se determinará mediante las cantidades específicas de los diversos estados de oxidación de los cationes metálicos presentes (por ejemplo  $Ce^{3+}$  y  $Ce^{4+}$ ), de manera que se mantiene la neutralidad de la carga. Para las fases no estequiométricas descritas nominalmente como dióxidos metálicos, esto se representa en la fórmula química  $MO_{2-\delta}$  en la que el valor de  $\delta$  (delta) puede variar. Para los óxidos de cerio,  $CeO_{2-\delta}$ , el valor de  $\delta$  (delta) normalmente oscila entre aproximadamente 0,0 y aproximadamente 0,5, indicando el primero óxido de cerio (IV),  $CeO_2$ , indicando el último óxido de cerio (III),  $CeO_{1,5}$  (indicado alternativamente como  $Ce_2O_3$ ). Alternativamente, el valor de  $\delta$  (delta) indica la cantidad de vacantes de oxígeno presentes en relación con óxido de cerio (IV) ( $CeO_2$ ). Por cada vacante de dianión de oxígeno presente, están presentes dos iones cerosos ( $Ce^{3+}$ ), para conservar la neutralidad de la carga. En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento que comprende: formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), un oxidante y agua; opcionalmente calentar o enfriar la mezcla de reacción; y formar directamente, sin aislamiento, una dispersión de nanopartículas estable.

65 En diversas realizaciones, la razón molar de ácido cítrico con respecto a EDTA en la mezcla de reacción oscila entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 1:9; entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 2:1; y entre aproximadamente 1,2:1,0 y aproximadamente 1:9.

- En diversas realizaciones, el oxidante incluye oxígeno molecular o aire, o compuestos más oxidantes que el oxígeno molecular (o una atmósfera de aire ambiental). En otras realizaciones, el oxidante tiene un potencial de reducción de semicelda en medio acuoso mayor de -0,13 voltios en relación con el electrodo de hidrógeno convencional. En realizaciones particulares, el oxidante es un metal alcalino o perclorato, clorato, hipoclorito o persulfato de amonio; ozono, un peróxido o una combinación de los mismos. En una realización particular, se usa un oxidante de dos electrones, tal como peróxido de hidrógeno. En realizaciones particulares, el peróxido de hidrógeno está presente en una cantidad mayor que la mitad de la cantidad molar de ion ceroso. Todavía en otras realizaciones, la cantidad de oxidante presente varía ampliamente en relación con la cantidad de iones cerio u otros iones metálicos presentes.
- En una realización particular, se hace pasar oxígeno molecular a través de la mezcla de reacción.
- En realizaciones particulares, la temperatura de la mezcla de reacción es mayor o menor que la temperatura ambiental. En realizaciones particulares, la mezcla de reacción se calienta o se enfría hasta temperaturas mayores o menores que la temperatura ambiental. En diversas realizaciones, la mezcla de reacción se calienta o se enfría hasta temperaturas mayores de aproximadamente 30°C, mayores de aproximadamente 40°C, mayores de aproximadamente 50°C, mayores de aproximadamente 60°C, mayores de aproximadamente 70°C, mayores de aproximadamente 80°C o mayores de aproximadamente 90°C. En una realización particular, la mezcla de reacción se calienta o se enfría hasta una temperatura menor que la temperatura de ebullición del agua.
- En diversas realizaciones, las nanopartículas formadas son amorfas, semicristalinas o sustancialmente cristalinas o cristalinas. En una realización particular, las nanopartículas formadas se caracterizan por una estructura de cristal de fluorita cúbica. En una realización particular, las nanopartículas formadas se caracterizan por una estructura de cristal de óxido de cerio.
- Tal como se usa en el presente documento, los términos semicristalina y sustancialmente cristalina se refieren a nanopartículas que tienen al menos cierta estructura cristalina. Tal como reconoce un experto habitual en la técnica, la caracterización precisa de partículas se vuelve cada vez más difícil a medida que el tamaño de partícula se hace más pequeño porque las partículas más pequeñas tienen menos orden de largo alcance detectable.
- En al menos una realización, las nanopartículas son cristalinas y pueden ser monocristalinas o policristalinas.
- En realizaciones particulares, la cristalinidad de las nanopartículas formadas se potencia mediante el calentamiento de la mezcla de reacción.
- En realizaciones particulares, las nanopartículas formadas se deshidratan o deshidroxilan mediante el calentamiento de la mezcla de reacción.
- En diversas realizaciones, las nanopartículas formadas tienen un diámetro hidrodinámico menor de 100 nm, menor de 80 nm, menor de 60 nm, menor de 40 nm, menor de 20 nm, menor de 10 nm, menor de 5,0 nm, menor de aproximadamente 3 nm o menor de aproximadamente 2,0 nm.
- En una realización particular, las nanopartículas formadas tienen un diámetro geométrico menor que el diámetro hidrodinámico.
- En diversas realizaciones, las nanopartículas formadas tienen un coeficiente de variación (COV) del tamaño de partícula, definido como la desviación estándar del tamaño de partícula dividida entre el tamaño de partícula promedio, menor de aproximadamente el 15%, menor de aproximadamente el 10%, menor de aproximadamente el 5%, o menor de aproximadamente el 3%.
- En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio. En otras realizaciones, se proporcionan nanopartículas que comprenden un óxido de cerio, un hidróxido de cerio o un oxihidróxido de cerio.
- En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético y un óxido de cerio, hidróxido de cerio u oxihidróxido de cerio.
- En otras realizaciones, se proporciona una nanopartícula que tiene un potencial zeta menor de o igual a cero. En realizaciones particulares, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético y que tiene un potencial zeta menor de o igual a cero. En realizaciones particulares, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético, y que tiene un potencial zeta menor de -10 mV, menor de -20 mV, menor de -30 mV, menor de -40 mV o menor de aproximadamente -50 mV. En realizaciones particulares, se proporciona una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético, y que tiene un potencial zeta en el intervalo de -15 mV a -30 mV.
- En realizaciones particulares, se proporciona una nanopartícula que tiene un potencial zeta mayor de cero. En realizaciones particulares, se proporciona una nanopartícula que comprende cerio, ácido cítrico, ácido

etilendiaminatetraacético, y que tiene un potencial zeta mayor de cero, mayor de 10 mV, mayor de 20 mV, mayor de 30 mV, mayor de 40 mV o mayor de 50 mV.

5 En diversas realizaciones, el potencial zeta de la nanopartícula se altera ajustando el pH, el contenido en ácido cítrico y/o ácido etilendiaminatetraacético, o una combinación de los mismos, de la dispersión de nanopartículas.

En una realización particular, el potencial zeta de la nanopartícula se altera ajustando el contenido en ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético de la dispersión de nanopartículas hasta menos de la cobertura de saturación.

10 En otra realización, el potencial zeta de la nanopartícula se altera ajustando tanto el pH de la dispersión de nanopartículas como el contenido en ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético hasta menos de la cobertura de saturación.

15 En diversas realizaciones, la dispersión de nanopartículas que contienen cerio contiene nanopartículas sustancialmente no aglomeradas, más del 90 por ciento de nanopartículas no aglomeradas, más del 95 por ciento de nanopartículas no aglomeradas, más del 98 por ciento de nanopartículas no aglomeradas, y nanopartículas no aglomeradas en su totalidad.

20 En una realización particular, las nanopartículas no aglomeradas son cristalinas, y se denominan alternativamente cristalitas de partícula única o cristalitas individuales.

25 En una realización particular, la dispersión de nanopartículas formada se lava para retirar los iones en exceso o sales como subproducto. En diversas realizaciones, la dispersión de nanopartículas se lava de manera que la conductividad iónica se reduce hasta menos de aproximadamente 15 milisiemens por centímetro (mS/cm), menos de aproximadamente 10 mS/cm, menos de aproximadamente 5 mS/cm o menos de aproximadamente 3 mS/cm. En realizaciones particulares, la dispersión de nanopartículas formada se lava mediante diálisis, diafiltración o centrifugación.

30 En realizaciones particulares, la dispersión de nanopartículas formada se concentra para retirar el disolvente en exceso o el agua en exceso. En realizaciones particulares, la dispersión de nanopartículas se concentra mediante diálisis, diafiltración o centrifugación.

35 En diversas realizaciones, la concentración de nanopartículas en la dispersión es mayor de aproximadamente 0,05 molal, mayor de aproximadamente 0,5 molal o mayor de aproximadamente 2,0 molal (aproximadamente el 35% de sólidos en una dispersión dada).

40 En realizaciones particulares, las distribuciones de tamaño de las nanopartículas son sustancialmente monomodales. En otras realizaciones, el tamaño de nanopartícula tiene un coeficiente de variación (COV) menor de aproximadamente el 30%, menor de aproximadamente el 25%, menor de aproximadamente el 20%, menor de aproximadamente el 15%, menor de aproximadamente el 10% o menor de aproximadamente el 5%, donde el COV se define como la desviación estándar dividida entre la media.

45 En realizaciones particulares, se emplean diversos dispositivos de mezclado conocidos en la técnica para remover, mezclar, cizallar o agitar el contenido de la mezcla de reacción. En diversas realizaciones, se usan mezcladoras que comprenden barras de agitación, palas de hélice marinas, turbinas de pala inclinada o turbinas de pala plana. En una realización particular, se emplea una mezcladora de alta cizalladura que fuerza a la mezcla de reacción a pasar a través de un tamiz que comprende orificios que oscilan en tamaño desde fracciones de un milímetro hasta varios milímetros. En realizaciones particulares, se emplea un molino coloidal o una mezcladora de alta cizalladura Silverson®. En realizaciones particulares, se introduce uno o más de los reactivos por debajo de la superficie de la mezcla de reacción acuosa. En una realización particular, se introduce un reactivo por debajo de la superficie de la mezcla de reacción acuosa en estrecha proximidad a un dispositivo de mezclado.

50 En una realización de la invención, se emplea un procedimiento de disolvente que cambia la dispersión acuosa de nanopartículas a una composición de disolvente menos polar mediante métodos dados a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense cedida comúnmente 2010/0152077. En una realización específica, la dispersión de nanopartículas se hace pasar a través de una columna de diafiltración con un diluyente orgánico que comprende, por ejemplo, un alcohol o un glicol éter.

55 En al menos una realización, la dispersión de nanopartículas que contienen cerio es estable durante al menos 2 meses, tal como, por ejemplo, al menos 12 meses.

60 Sin querer restringirse a cualquier teoría, el uso propuesto de óxidos de cerio para el tratamiento de la inflamación y enfermedades relacionadas con estrés oxidativo (por ejemplo enfermedades mediadas por ROS) se basa en parte en la creencia de que los óxidos de cerio pueden funcionar como eliminadores catalíticos de radicales libres. La existencia de y la interconversión fácil de cerio en una mezcla de estados de valencia de Ce<sup>3+</sup> y Ce<sup>4+</sup> puede permitir que los óxidos de cerio reduzcan y/o oxiden radicales libres a especies menos perjudiciales de una manera catalítica

o autorregenerativa. Pueden producirse reacciones redox sobre la superficie de nanopartículas de óxido de cerio (CeNP) que neutralizan radicales libres que dañan tejidos. Por ejemplo, se cree que es deseable oxidar el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para dar oxígeno molecular, oxidar el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) para dar especies fisiológicamente benignas y reducir el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) para dar anión hidróxido. Esto puede permitir a su vez un régimen de dosificación enormemente reducido en comparación con, por ejemplo, antioxidantes de protección disponibles actualmente para tratar enfermedades y acontecimientos relacionados con estrés oxidativo.

En realizaciones particulares, las partículas de nanocería administradas de la invención se introducen en células a través de las membranas celulares y residen en el citoplasma celular o en diversos orgánulos celulares, tales como el núcleo y la mitocondria. En otras realizaciones, las partículas de nanocería de la invención residen en espacios intravasculares o intersticiales, en los que pueden reducir el estrés oxidativo y la inflamación eliminando radicales libres o reduciendo las respuestas autoinmunitarias. En una realización particular, la invasión por el sistema inmunitario del sistema nervioso central que resulta de la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) o la barrera de líquido cefalorraquídeo (BLCR) o la barrera hemato-ocular (BHO) se modula por las partículas de nanocería de la invención.

En otra realización, las partículas de nanocería de la invención son partículas que pueden atravesar la barrera hematoencefálica de un mamífero. En diversas realizaciones, las partículas de nanocería de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica de un mamífero y residen en tejidos de parénquima cerebral como agregados o aglomerados de un tamaño menor de aproximadamente 100 nm, menor de aproximadamente 50 nm, menor de aproximadamente 20 nm, menor de aproximadamente 10 nm, menor de aproximadamente 5 nm. En una realización particular, las partículas de nanocería de la invención atraviesan la barrera hematoencefálica de un mamífero y residen en tejidos de parénquima cerebral como nanopartículas no aglomeradas independientes de un tamaño menor de aproximadamente 3,5 nm.

En realizaciones particulares, se contempla específicamente una composición farmacéutica que comprende partículas de nanocería de la invención para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y acontecimientos relacionados con estrés oxidativo, tales como, pero sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia, ataxia de Friedreich, autismo, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, migraña, accidente cerebrovascular, lesión cerebral por traumatismo, cáncer, inflamación, trastornos autoinmunitarios, lupus, EM, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, estenosis, reestenosis, aterosclerosis, síndrome metabólico, disfunción endotelial, vasoespasmos, diabetes, envejecimiento, fatiga crónica, cardiopatía coronaria, fibrosis cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión, angina, angina de Prinzmetal, isquemia, angioplastia, hipoxia, enfermedad de Keshan, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fabismo, lesión por isquemia-reperusión, artritis reumatoide y osteoartritis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo enfisema y bronquitis), alergias, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad renal crónica, injerto renal, nefritis, daño por radiación ionizante, eritema solar, dermatitis, melanoma, soriasis, degeneración macular, degeneración retiniana, cataractogénesis, entre otras.

En realizaciones particulares, se contempla específicamente una composición farmacéutica que comprende partículas de nanocería de la invención para la prevención y/o el tratamiento de patologías celulares relacionadas con estrés oxidativo, tales como, pero sin limitarse a, disfunción mitocondrial, disfunción de lisosomas y proteasomas, oxidación de ácidos nucleicos (por ejemplo ARN y ADN), nitración de tirosina, pérdida de cascadas de señalización mediada por fosforilación, iniciación de apoptosis, peroxidación de lípidos y destrucción del entorno lipídico de la membrana.

En al menos una realización, se administra una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen cerio obtenidas según la presente invención en una cantidad eficaz para tratar profilácticamente una enfermedad relacionada con estrés oxidativo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de una composición farmacéutica que comprende principio activo suficiente (por ejemplo, nanopartículas que contienen cerio) para provocar el efecto deseado. La cantidad farmacéuticamente eficaz, tal como se reconoce en la técnica, puede determinarse a través de experimentación de rutina.

En al menos una realización, se administra una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen cerio obtenidas según la presente invención en una cantidad eficaz para tratar síntomas de una enfermedad relacionada con estrés oxidativo.

En diversas realizaciones, se administra una composición farmacéutica que comprende partículas de nanocería de la invención a un sujeto humano o no humano, tal como otro animal, incluyendo, pero sin limitarse a, un animal canino, felino bovino, equino, ovino, porcino o un roedor. Alternativamente, el sujeto de administración puede ser un animal tal como un pájaro, insecto, reptil, anfibio o cualquier animal de compañía o de granja.

En diversas realizaciones, se administran partículas de nanocería de la invención *in vivo* a un sujeto mediante métodos tópicos, enterales o parenterales, incluyendo inyecciones, infusiones o implantaciones. Más particularmente, se contempla específicamente administrar partículas de nanocería de la invención mediante

5 cualquiera de las siguientes vías: auricular (ótico), bucal, conjuntival, cutánea, dental, electroósmosis, endocervical, endosinusal, endotraqueal, enteral, epidural, extraamniótica, extracorpórea, hemodiálisis, infiltración, intersticial, intraabdominal, intraamniótica, intraarterial, intrabiliar, intrabronquial, intrabursal, intracardiaca, intracartilaginosa, intracaudal, intracavernosa, intracavitaria, intracerebral, intracisternal, intracorneal, intracoronario-dental, intracoronaria, intra-cuerpo cavernoso, intradérmica, intradiscal, intraductal, intraduodenal, intradural, intraepidérmica, intraesofágica, intragástrica, intragingival, intraileal, intralesional, intraluminal, intralinfática, intramedular, intrameningea, intramuscular, intraocular, intraovárica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrasinusal, intraespinal, intrasinovial, intratendinosa, intratesticular, intratecal, intratorácica, intratubular, intratumoral, intratimpánica, intrauterina, intravascular, intravenosa, bolo intravenoso, goteo intravenoso, intraventricular, intravesical, intravítrea, iontoforesis, irrigación, laríngea, nasal, nasogástrica, técnica de vendaje oclusivo, oftálmica, oral, orofaríngea, parenteral, percutánea, periarticular, peridural, perineural, periodontal, rectal, respiratoria (inhalación), retrobulbar, tejido blando, subaracnoidea, subconjuntival, subcutánea, sublingual, submucosa, tópica, transdérmica, transmamária, transmucosa, transplacentaria, transtraqueal, transtimpánica, ureteral, uretral, vaginal, y cualquier otra vía o vía no asignada. En otras realizaciones, se retienen partículas de nanocería de la invención en o sobre la superficie de un dispositivo médico o prótesis, tal como una cánula, catéter o endoprótesis, reduciendo así la inflamación de manera local o sistémica, a lo largo de un periodo de tiempo o bien corto o bien largo.

20 En diversas realizaciones, las partículas de nanocería de la invención se administran de cualquier forma adecuada conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, una suspensión, gel, comprimido, comprimido recubierto entérico, liposoma cargado, polvo, supositorio, medicamento infusible, pastilla para chupar, crema, loción, bálsamo o medicamento inhalado.

25 En diversas realizaciones, las partículas de nanocería de la invención se combinan con otras sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitarse a, agua, sales, tampones, solución salina tamponada con fosfato (PBS), azúcares, albúmina sérica humana o bovina, lípidos, fármacos, colorantes, aromatizantes, aglutinantes, gomas, tensioactivos, cargas o cualquier excipiente conocido en la técnica. En una realización particular, el vehículo que comprende las partículas de nanocería de la invención se esteriliza antes de la administración.

30 En otras realizaciones, se pone en contacto una célula o cultivo celular con una partícula o partículas de nanocería de la invención. El contacto puede ponerse en práctica exponiendo una célula o cultivo celular mediante métodos *in vitro* o *ex vivo*, en el que este último método comprende reintroducir la célula o células tratadas en un sujeto, tal como el sujeto del que se obtuvo originalmente la célula o células. En diversas realizaciones, la célula es de naturaleza procariota o eucariota. En realizaciones particulares, las células tratadas se usan en la producción de proteínas usadas en la industria farmacéutica, conocidas generalmente como productos biológicos, tales como, pero sin limitarse a, antígenos, anticuerpos y vacunas. En otra realización, las células tratadas se usan en un procedimiento de fermentación.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar la invención en modo alguno.

### Sección experimental

45 Evaluaciones de tamaño y dispersión de luz de nanopartículas

50 Se realizó una caracterización cualitativa sencilla de las dispersiones de partículas evaluando el grado de dispersión de Tyndall mostrado por las dispersiones cuando se iluminan por una luz de lápiz láser roja, en relación con la cantidad de dispersión de una muestra del disolvente puro. Se realizó una evaluación cuantitativa del tamaño de partícula de las dispersiones de nanopartículas mediante dispersión dinámica de luz (DLS) usando un analizador del tamaño de partícula Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments Corp., Holtzville, Nueva York, EE.UU.) equipado con una cubeta de cuarzo. Los tamaños mediante DLS notificados son el parámetro ponderado en número de distribución logarítmica normal.

55 Evaluación de la carga de las nanopartículas

Se realizó una evaluación cuantitativa de la carga de las nanopartículas midiendo el potencial zeta usando un dispositivo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments.

60 Preparación de nanopartículas de ceria con ácido cítrico y EDTA

65 En un vaso de precipitados de vidrio de 800 ml que contenía una barra de agitación magnética se introdujeron 500 ml de agua de alta pureza (HP). Entonces se calentó el agua hasta aproximadamente 70°C, y en ella se disolvieron 2,41 g de ácido cítrico (AC) y 4,27 g de la sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético (EDTA). Se añadió hidróxido de amonio (el 28-30%) para ajustar el pH de la disolución hasta aproximadamente 8,5. Se elevó la temperatura del vaso de reacción hasta aproximadamente 80°C, y se reemplazó la barra de agitación magnética por

una mezcladora de alta cizalladura Silverson® L4RT que se hizo funcionar a 5000 rpm. Se disolvió una cantidad de 10,0 g de  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$  en 30 ml de agua HP, y se añadió esta disolución lentamente a la mezcla de reacción agitada durante varios minutos. Se mantuvo el pH de la reacción a aproximadamente 8,5 mediante la adición de pequeñas cantidades de disolución concentrada de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Entonces, se añadieron lentamente 50 ml de disolución que contenía 4,8 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 50% (razón molar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con respecto a cerio de 3,0) a lo largo de varios minutos a la mezcla de reacción de ion ceroso, ácido cítrico, EDTA. Se cubrió el producto de reacción y entonces se calentó durante una hora adicional, dando como resultado una suspensión transparente amarilla/naranja. Tras enfriar con agitación, se lavó la dispersión de nanopartículas formada directamente mediante diafiltración hasta una conductividad iónica de menos de aproximadamente 10 mS/cm, para retirar las sales en exceso. El pH de la dispersión producto fue de aproximadamente 7,2.

La dispersión producto final era un líquido transparente amarillo/naranja que presentaba un alto grado de dispersión de Tyndall cuando se iluminaba con un haz de láser de baja intensidad, indicando que contenía partículas coloidales bien dispersas. Se observó que la dispersión producto final era estable durante al menos 12 meses, sin indicación de aglomeración o sedimentación de partículas. El análisis del tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz en siete preparaciones repetidas produjo un diámetro hidrodinámico promedio de 3,1 nm con una desviación estándar de 0,30 nm (COV del 10%). Las nanopartículas de ceria preparadas mediante este método en las que se añadieron cantidades equimolares (50/50) de ácido cítrico y EDTA, se denominan en el presente documento de diversas maneras como nanopartículas de ceria con AC/EDTA, nanocería con AC/EDTA, CeNP, CNRx o CNRx 87.

Las preparaciones repetidas de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA se sometieron a identificación de fase y análisis del tamaño de cristalita mediante difracción de rayos X de polvo (XRD). Se colocaron porciones de muestra en una navecilla de teflón, se secaron bajo una lámpara de calor durante cuatro horas, y entonces se secaron en un horno durante cuatro horas a 80°C a vacío. Los sólidos resultantes se molieron ligeramente para formar polvos. Estos polvos se empaquetaron entonces sobre soportes de vidrio y se analizaron mediante un accesorio de células en seco mediante N2.

El análisis de los espectros de XRD de tres preparaciones repetidas particulares de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA mostrado en la figura 1, indicó que cada muestra contenía una fase cristalina principal isoestructural con  $\text{CeO}_2$  (PDF n.º 34-394, cerianita). Se determinó un tamaño de cristalita promedio de 2,4 nm con una desviación estándar de 0,06 nm (COV del 2,5%) en la dirección de  $\text{CeO}_2$  (220) para las siete muestras repetidas usando la técnica de Scherrer.

Micrografías de TEM de resolución moderadamente alta de nanopartículas de ceria con AC/EDTA secadas (figura 2) revelaron un conjunto de partículas individuales (no aglomeradas) con diámetros del orden de 2-3 nm. Micrografías de TEM de resolución superior de nanopartículas de ceria con AC/EDTA secadas (figura 3) revelaron ordenaciones individuales de átomos en nanopartículas seleccionadas. Se determinó una distribución por clase de tamaño a partir de las micrografías de TEM, tal como se muestra en la figura 4.

Las mediciones del potencial zeta mostraron una carga promedio de -23 mV para estas dispersiones acuosas de preparaciones repetidas de nanopartículas de ceria con AC/EDTA.

Se repitió la preparación de nanopartículas de ceria con AC/EDTA descrita anteriormente excepto en que la razón molar de los estabilizadores de ácido cítrico y EDTA se ajustó a 100/0, 80/20, 70/30, 60/40, 40/60, 30/70, 20/80 y 0/100, mientras se mantenía una cantidad molar total constante de estabilizador. Resultaron dispersiones estables de nanopartículas de óxido de cerio con características físicas sustancialmente similares (tamaño de partícula y potencial zeta), tal como se muestra en la tabla 1 a continuación.

Evaluación de nanopartículas de óxido de cerio en diversas enfermedades relacionadas con estrés oxidativo

Accidente cerebrovascular isquémico

Modelo de accidente cerebrovascular isquémico en corte cerebral de hipocampo de ratón

Se evaluó la capacidad de la nanocería para reducir el estrés oxidativo en una modificación del modelo de isquemia en corte cerebral de hipocampo de ratón *in vitro* descrito por Estevez, AY; *et al.*, Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia, *Free Radic. Biol. Med.* (2011)51(6):1155-63 (doi:10.1016/j.radbiomed.2011.06.006).

Se sacrificaron ratones CD1 adultos (2-5 meses de edad) mediante decapitación rápida y se extirparon rápidamente sus cerebros y se colocaron en una disolución de corte a base de colina enfriada que contenía bicarbonato de colina 24 mM, cloruro de colina 135 mM, ácido quinurémico 1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, glucosa 10 mM, KCl 1 mM y  $\text{MgCl}_2$  20 mM (315 mOsm). Se realizaron cortes de hipocampo transversales, de 400  $\mu\text{m}$  de espesor, a lo largo de un eje rostro-caudal (de -1,2 a -2,8 mm de bregma) usando un dispositivo Leica VT1200 Vibratome (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se dejó que se recuperara durante 1 h en un líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) de control que contenía NaCl 124 mM, KCl 3 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,4 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,3 mM,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  1,24 mM,  $\text{NaHCO}_3$

26 mM, glucosa 10 mM y se burbujeó con el 5% de CO<sub>2</sub>, el 95% de gas O<sub>2</sub> (pH 7,4, 300 mOsm). Los cortes de hipocampo se colocaron en una placa de cultivo y se almacenaron en un incubador humidificado NuAire (NuAire, Plymouth, MN, EE.UU.) a 37°C con el 5% de CO<sub>2</sub> durante hasta 48 h.

- 5 Se indujo estrés oxidativo a partir de isquemia colocando los cortes cerebrales en aCSF hipoglucémico, ácido e hipóxido (la glucosa y el pH se disminuyeron hasta 2 mM y 6,8, respectivamente, y la disolución se burbujeó con el 84% de N<sub>2</sub>, el 15% de CO<sub>2</sub> y el 1% de O<sub>2</sub>) a 37°C durante 30 min. Se añadió sacarosa para mantener la osmolaridad de la disolución a aproximadamente 295 mOsm.
- 10 Se administraron dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de cerio preparadas tal como se describió anteriormente en la dosificación correspondiente en un volumen de administración de 1 µg por 1 ml de aCSF o medio (equivalente a 5,8 µM) en el momento de la aparición del acontecimiento isquémico, y se mantuvieron en el medio durante todo el resto del experimento. Los cortes de control recibieron un volumen igual de control con vehículo. Se usaron diversos vehículos de administración con éxito similar para las nanopartículas de óxido de cerio
- 15 preparadas tal como se ha descrito en el presente documento, incluyendo agua destilada sola, solución salina, disolución de citrato de Na, PBS y combinaciones de los mismos.

Tras la exposición a 30 minutos de estrés oxidativo (condiciones isquémicas), los cortes de cerebro vivo (de prueba y de control) se incubaron durante 24 h en cultivo organotípico colocándolos en una placa de cultivo de 35 mm que contenía medio de cultivo e insertos Millipore (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). El medio de cultivo contenía el 50% de medio esencial mínimo (Hyclone Scientific, Logan UT, EE.UU.), el 25% de suero de caballo, el 25% de solución salina equilibrada de Hank (complementada con glucosa 28 mM, HEPES 20 mM y NaHCO<sub>3</sub> 4 Mm), penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 ml/ml, pH 7,2.

- 25 Se midió el grado de muerte celular 24 horas tras la lesión oxidativa usando técnicas de obtención de imágenes de fluorescencia. A cada conjunto de cortes cerebrales estudiado en la condición de prueba (es decir, con administración de nanopartículas de óxido de cerio) le correspondió un conjunto similar de cortes cerebrales de control tratados de manera idéntica en todo excepto para la administración de vehículo solo. Por tanto, en cada día de estudio, dos conjuntos de cortes cerebrales anatómicamente correspondientes tomados de crías de edad correspondiente y sexo correspondiente se sometieron o bien a la condición de prueba (administración con nanopartículas de óxido de cerio) o bien al control (vehículo solo). Durante las mediciones mediante obtención de imágenes de fluorescencia, la intensidad luminosa, la duración de la captura de imagen y el tiempo de recogida de imágenes fueron idénticos para los cortes cerebrales en la condición de prueba y de control con vehículo. Los resultados se expresaron como la razón de la fluorescencia en la condición de prueba con respecto a la fluorescencia en el corte de control correspondiente en el mismo punto de tiempo en la secuencia experimental.

A las 24 horas tras la lesión oxidativa, se incubaron cortes cerebrales emparejados (de control y de prueba) durante 20 min en medio de cultivo que contenía colorante de exclusión vital SYTOX® Green (Invitrogen, Carlsbad, AC, EE.UU.) 0,81 µM y, posteriormente, se lavaron durante 15-20 min en medio de cultivo para retirar el colorante no incorporado. SYTOX® Green es un colorante fluorescente que se une a ADN y ARN. Sin embargo, queda excluido del núcleo celular por la membrana celular en células viables intactas. Por tanto, actúa como colorante vital y tiñe sólo las células muertas y que están muriendo en las que la membrana celular se ha vuelto permeable de modo que el colorante tiene acceso al interior de la célula. Tras teñir y lavar, se transfirieron los cortes cerebrales a la platina de un microscopio Nikon TE 2000-U (Nikon Instruments, Melville, NY, EE.UU.) equipado con accesorios de epifluorescencia y una fuente de luz de xenón de 150 W (Optiquip, Highland Mills, NY, EE.UU.). Se cargó disolución de aCSF de control en jeringas de 60 ml, se equilibró con el 95% de O<sub>2</sub>/el 5% de CO<sub>2</sub> y se calentó hasta 37°C usando un bloque calentador de jeringa servocontrolado, calentador de platina y calentador de perfusión en línea (Warner Instruments, Hamden, CT, EE.UU.). Los cortes cerebrales se perfundieron de manera continua con aCSF calentado equilibrado con el 95% de O<sub>2</sub>/el 5% de CO<sub>2</sub> a una tasa de 1 ml por minuto. Tras 5 min, se recogieron imágenes de la formación de hipocampo de cada corte cerebral de control y de prueba usando un objetivo 4x Plan Flour (Nikon Instruments) en condiciones idénticas (es decir, intensidad luminosa, tiempo de exposición, parámetros de adquisición de la cámara). Se midió la fluorescencia de SYTOX® Green excitando brevemente (620 ms) el tejido a 480 ± 40 nm, filtrando la fluorescencia emitida (535 ± 50 nm) a partir de la sonda usando un espejo dicróico de paso largo de 505 nm (Chroma technology, Bennington, VT, EE.UU.), intensificando y midiendo con una cámara CCD enfriada de ganancia EM (Hamamatsu CCD EM C9100; Bridgewater, NJ, EE.UU.). Las imágenes digitales se adquirieron y se procesaron con software Compix SimplePCI 6.5 (C Imaging Systems, Cranberry Township, PA, EE.UU.).

La intensidad luminosa que resulta de la carga de SYTOX® Green reflejó el número de células muertas o que estaban muriendo dentro de la zona calculada. Las mediciones de la intensidad luminosa se realizaron automáticamente usando el software Compix SimplePCI 6.5, eliminando de ese modo el sesgo del investigador en la selección de las regiones de interés.

La reducción en la muerte celular se notifica como la razón de la intensidad luminosa de la fluorescencia de SYTOX® Green de los campos del asta de Ammon (capa oriens, estrato radiado y lagunoso molecular) para la condición de la prueba (es decir, tratadas con nanocería) con respecto al control (sin tratar) para cortes del

hipocampo anatómicamente correspondientes tomados de cerebros de crías de edad correspondiente y sexo correspondiente cortados y expuestos a estrés oxidativo isquémico el mismo día, y cuyas imágenes de fluorescencia se tomaron 24 h tras el ataque isquémico.

5 Se evaluaron nanopartículas de óxido de cerio preparadas con estabilizadores biocompatibles que comprendían ácido cítrico, EDTA y combinaciones de los mismos en el modelo de accidente cerebrovascular isquémico en corte cerebral de hipocampo de ratón usando una concentración de tratamiento de 5,8  $\mu$ M. Los resultados para la reducción en la muerte celular (reducción en porcentaje en relación con control), denominado comúnmente preservación, en función de la razón molar de ácido cítrico con respecto a EDTA se facilitan en la tabla 1 a

10 continuación.

Tabla 1

Razón AC/EDTA	Tamaño de partícula		Resultados de preservación		Sinergia de preservación	
	XRD (nm)	DLS (nm)	Real (%)	Predictiva (%)	Real - predictiva (%)	Real/predictiva
100/0	2,0	7,8	15,5	15,5	0	1
80/20	2,4	3,4	6,0	12,8	-6,8	0,5
70/30	2,3	3,8	21,6	11,4	10,2	1,9
60/40	2,4	2,6	11,3	10,0	1,3	1,1
50/50	2,4	3,1	30,3	8,65	21,65	3,5
40/60	2,5	2,9	26,3	7,3	19,0	3,6
30/70	2,5	3,0	23,0	5,9	17,1	3,9
20/80	2,4	3,5	6,9	4,5	2,4	1,5
0/100	2,1	2,4	1,8	1,8	0	1

15 El tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con ácido cítrico solo como estabilizador (100/0) redujo la muerte celular (preservación) aproximadamente en el 16%, mientras que el tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con EDTA solo como estabilizador (0/100) tuvo poco efecto sobre la muerte celular (reducción del 1,8%). La reducción adicional en la muerte celular, alternativa denominada aumento en la preservación, es una característica deseable de una composición farmacéutica o medicamento. El tratamiento con

20 nanopartículas de óxido de cerio preparadas con una combinación de ácido cítrico y EDTA en una razón molar que oscila entre 70/30 y 20/80 dio como resultado aumentos sorprendentes en la preservación que superaron sustancialmente la suma aditiva predictiva lineal simple basándose en los efectos de cada estabilizador usado solo. Por ejemplo, la mayor preservación (aproximadamente del 30%) se observó para la razón equimolar (50/50) de ácido cítrico con respecto a EDTA, mientras que la predicción lineal simple para nanopartículas preparadas con esta

25 combinación de estabilizadores es el promedio de una preservación del 15,5% para ácido cítrico solo y una preservación del 1,8% para EDTA solo, lo que constituye sólo una preservación del 8,65%. Por tanto, se ha descubierto una sinergia sorprendente e inesperada entre la combinación de estabilizadores de ácido cítrico y EDTA, en la que la preservación real para ácido cítrico y EDTA equimolares (50/50) es aproximadamente 3,5 veces mayor que la predicción lineal simple.

30 En general, un modelo lineal simple (aditivo) para el porcentaje de preservación predictiva para una razón dada de de ácido cítrico con respecto a EDTA, viene dado por la expresión:

$$[\text{Fracción de AC}] * [\% \text{ de preservación de AC}] + [\text{fracción de EDTA}] * [\% \text{ de preservación de EDTA}]$$

35 en la que la fracción de un estabilizador dado es la fracción molar del estabilizador total presente. Para los resultados mostrados en la tabla 1, el % de preservación de AC es del 15,5% y el % de preservación de EDTA es del 1,8%.

40 Los valores de esta expresión (porcentaje de preservación predictiva) se tabularon anteriormente en la tabla 1 en la columna titulada resultados de preservación y predictiva (%).

45 En general, el aumento sinérgico en la preservación puede representarse en dos parámetros distintos. La diferencia entre las cantidades de preservación real y predictiva (real - predictiva) representa la sinergia de manera absoluta, para la que un valor positivo representa preservación adicional inesperada (resultado inventivo) y un valor negativo representa menos de la cantidad esperada de preservación (es decir, una interacción o interferencia negativa entre los estabilizadores). Alternativamente, la razón de real frente a predictiva (real/predictiva) representa la sinergia de manera relativa, para la que un valor mayor de uno representa la cantidad relativa de preservación inesperada adicional (resultado inventivo), y un valor de menos de uno representa la cantidad relativa de preservación menor

50 que la cantidad predictiva esperada debido a una interacción o interferencia negativa entre los estabilizadores (resultado comparativo).

El examen de estos parámetros en las columnas de sinergia de preservación en la tabla 1 revela, una vez más, que

el tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con una combinación de ácido cítrico y EDTA en una razón molar que oscila entre 70/30 y 20/80 dio como resultado un aumento sinérgico en la preservación absoluta (el valor de (real - predictiva) es positivo) junto con un aumento sinérgico en la preservación relativa (el valor de (real/predictiva) es mayor de uno). La mayor cantidad de aumento de preservación sinérgica absoluta se produce para la razón de tratamiento de ácido cítrico con respecto a EDTA de 50/50, para la que se observa inesperadamente un 21,65% de preservación adicional. La mayor cantidad de aumento de preservación sinérgica relativa se produce para la razón de tratamiento de ácido cítrico con respecto a EDTA de 30/70, para la que la preservación real es 3,9 veces mayor que la predictiva.

En cambio, se observa una interacción o interferencia negativa para el tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con una combinación de ácido cítrico y EDTA en una razón molar de 80/20, para la que la preservación real absoluta fue del 6,8% menor que la predictiva, o, alternativamente, la preservación real relativa fue sólo la mitad (0,5 veces) de la predictiva. Por tanto, en resumen, se ha descubierto que el tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con razones molares de ácido cítrico con respecto a EDTA en un intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 0,1 dio como resultado un aumento sinérgico en la preservación, mientras que el tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio preparadas con una razón molar de ácido cítrico con respecto a EDTA de 4,0 dio como resultado una interferencia que conduce a menos de la preservación esperada.

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) que afecta a más de 2 millones de personas en todo el mundo. La EM se ha considerado durante mucho tiempo una enfermedad inflamatoria mediada por el sistema inmunitario que conduce, en parte, a la degeneración de la vaina de mielina que rodea a las células nerviosas y, en última instancia, a la muerte de células neuronales debido a estrés oxidativo. El curso más común de la enfermedad, denominado recaída/remisión, se caracteriza por ataques claramente definidos de empeoramiento de la función neurológica y motora, seguido por periodos de calma relativa (remisión) sin nuevos signos de actividad de la enfermedad. Un curso menos común de la enfermedad se denomina EM crónica-progresiva y se caracteriza por una progresión constante del daño neurológico clínico, sin remisión tras los síntomas iniciales de EM. Aunque sólo aproximadamente el 20% de los pacientes se diagnostican inicialmente con EM crónica-progresiva, aproximadamente la mitad de los diagnosticados inicialmente con EM con recaída/remisión evolucionarán a la forma crónica-progresiva cada diez años.

Esclerosis múltiple crónica-progresiva

Modelo de EAE murino de EM

Muchas de las características patológicas de la aparición de EM se modelan mediante el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) murino, en el que se induce un trastorno inflamatorio mediante inmunización con antígenos de mielina. El modelo de EAE se caracteriza por rotura de la barrera hematoencefálica (BHE), infiltración perivascular de células inmunitarias, activación de microglía y desmielinización. El modelo de EAE ha sido crítico en el desarrollo de terapias actuales en el tratamiento de la EM.

Se adquirieron ratones SJL-EAE de Jackson Laboratories (C57BL/6) y se trataron con vehículo o vehículo más nanopartículas de ceria con AC/EDTA. Las nanopartículas de ceria con AC/EDTA mezcladas en PBS/solución salina con citrato de sodio 50 mM se administraron a animales experimentales mediante inyección i.v. en la vena de la cola o bien antes (modelo preventivo) o bien después (modelo terapéutico) de la inducción de la enfermedad y entonces se administraron dosis de mantenimiento de concentraciones diferentes. En un experimento, se trató diariamente un subconjunto de ratones con el fármaco inmunomodulador fingolimod (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.) a 2 µg/l en agua potable. Los diversos regímenes de tratamiento (regímenes de dosificación) se describen en detalle en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Régimen de administración*	Día antes de la inducción	Día de la inducción	Día 3 tras la inducción	Dosis de mantenimiento: día 7 y después semanalmente
Preventivo	15 mg/kg de CeNP	15 mg/kg de CeNP	10, 20 ó 30 mg/mg de CeNP	10, 20 ó 30 mg/kg de CeNP
Terapéutico: después de 3 días	-----	-----	10, 20 ó 30 mg/kg de CeNP	10, 20 ó 30 mg/kg de CeNP
Terapéutico: después de 7 días	-----	-----	-----	30 mg/kg de CeNP o fingolimod**

5 Se indujo encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) a los ratones, es decir, síntomas similares a la esclerosis múltiple crónica progresiva, tal como sigue: a una inyección intravenosa (i.v.) en la cola de 0,1 ml de 200 µg de péptido de proteína (MOG<sub>35-55</sub>) de oligodendrocitos de mielina (Genscript) disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, le siguió una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de 200 ng de toxina pertúsica en PBS que se administró en los días 0 y 2.

10 La progresión de la enfermedad se puntuó diariamente usando una prueba de puntuación clínica descrita a continuación, junto con las tres pruebas de comportamiento motor diseñadas para evaluar la función cerebelar (barra de equilibrio), fuerza de las extremidades delanteras (varilla colgante) y fuerza de las extremidades traseras (barra giratoria).

Prueba de puntuación clínica

15 Se puntuó diariamente la progresión de la enfermedad de síntomas tipo de la esclerosis múltiple en los ratones con EAE usando una escala clínica adaptada de Selvaraj *et al.* (2008), tal como se muestra en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Puntuación de la enfermedad	Síntomas
0	Movimiento normal; sin parálisis
0,5	Cola inerte, la cola arrastra cuando el ratón camina. Sin embargo, el ratón puede enroscar la cola cuando se levanta
1,0	Parálisis total de la cola; la cola arrastra cuando el ratón camina. El ratón no puede enroscar la cola cuando se levanta
2,0	Parálisis parcial de las extremidades; cola inerte; el ratón camina con marcha torpe (tambaleante); no hay parálisis completa de ninguna extremidad
2,5	Parálisis parcial de las extremidades; cola inerte; el ratón no puede caminar; las extremidades todavía se mueven cuando el ratón se levanta
3,0	Una extremidad trasera completamente paralizada; cola inerte, el ratón arrastra las patas traseras, pero todavía puede moverse
3,5	Ambas extremidades traseras completamente paralizadas; cola inerte, el ratón arrastra las patas traseras, pero todavía puede moverse y comer
4,0	Ambas extremidades traseras paralizadas, una extremidad delantera paralizada; cola inerte, movimiento gravemente afectado; ratón sacrificado

20 Pruebas de comportamiento motor

Prueba de varilla colgante

25 Se usó una prueba de varilla colgante para evaluar la fuerza de agarre. Para esta tarea, se colocaron los ratones en una caja de plexiglás abierta por la parte superior con un suelo de rejilla de varillas de acero. Se dio la vuelta a la caja 60 cm por encima de la encimera y se midió la latencia hasta la caída.

Prueba de barra giratoria

30 Se usó un aparato de barra giratoria (Med Associates, St. Albans, VT) para evaluar principalmente el aguante y la coordinación motora de las extremidades traseras. Los ratones se colocaron sobre un tambor que giraba a 28 rpm y se midió la latencia hasta la caída del tambor (300 segundos, máximo).

Prueba de barra de equilibrio

35 Para esta tarea, se colocaron ratones sobre el extremo iluminado de una barra de madera elevada y se les dio hasta 60 s para alcanzar la caja objetivo. Se puntuaron el equilibrio y la calidad de marcha usando una escala de 5 puntos (de 5= marcha normal a 0 = caída de la barra inmediatamente). La calidad de la marcha se clasificó adicionalmente según la escala descrita a continuación.

40

Tabla 3

0	Cae de la barra
1	Se aferra a la barra; NO se mueve cuando se le estimula
2	Se aferra a la barra durante el tiempo máximo: EE MUEVE cuando se le estimula: EE MUEVE AGACHADO
2,5	Se aferra a la barra durante el tiempo máximo: EE MUEVE cuando se le estimula: CAMINA
3	Alterna aferrarse con moverse: EE MUEVE AGACHADO; NO camina por toda la barra en el tiempo

	permitido
3,5	Alterna aferrarse con moverse: CAMINA; NO camina por toda la barra en el tiempo permitido
4	Avanza por la barra pero NO alcanza la caja objetivo en el tiempo permitido O alterna aferrarse y moverse: CAMINA; SÍ camina por toda la barra en el tiempo permitido
5	Atraviesa toda la barra sin dificultad dentro del tiempo permitido

Las nanopartículas de ceria con AC/EDTA disminuyeron (mejoraron) los resultados de la puntuación clínica para los diseños de dosificación tanto preventiva como terapéutica y se muestran para la dosificación de 10 mg/kg en la figura 5 y para la dosificación de 20 mg/kg en la figura 6. Como medida de la gravedad de la enfermedad acumulativa, se calculó el área bajo la curva (AUC) de la puntuación clínica media frente al día tras la inducción (véase la figura 7), para cada animal que se dosificó al nivel de 20 mg/kg. Las nanopartículas de ceria con AC/EDTA disminuyeron (mejoraron) la gravedad clínica de manera dependiente de la dosis para el régimen de tratamiento preventivo (figura 8) y el régimen de tratamiento terapéutico después de 3 días (figura 9). En la figura 10 se muestra una visión global de la reducción en la gravedad de la enfermedad en función de la ceria total inyectada.

Acumulación tisular de ceria: Se sacrificó un subconjunto de ratones mediante sobredosis de isoflurano y se sometieron a perfusión transcárdica con PBS. Los tejidos recogidos se congelaron y se analizaron para determinar el contenido en cerio mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). En la figura 11 se muestra el contenido en cerio del cerebro en función de la ceria total inyectada.

Los resultados de las figuras 10-11 sugieren que la capacidad de penetración de las partículas en el SNC se correlaciona bien con la dosis administrada y no se satura en el intervalo de dosis sometidas a prueba.

La comparación de nanopartículas de ceria con AC/EDTA dosificadas al nivel de 30 mg/kg con el fármaco inmunomodulador fingolimod se muestra en los resultados de las figuras 12-15. Todos los grupos de tratamiento redujeron significativamente la gravedad de la enfermedad en relación con los controles durante tanto la fase A) aguda (figura 13) como la fase B) crónica (días 31-35) de la enfermedad ( $p < 0,05$ ) (figura 14). Los tratamientos con fingolimod y preventivo fueron significativamente más eficaces que el tratamiento terapéutico (después de 7 días) durante la fase aguda. Todos los grupos fueron igualmente eficaces durante la fase crónica de la enfermedad (días 31-35).

Además, el tratamiento con las nanopartículas de ceria con AC/EDTA mejoró el rendimiento del comportamiento motor de los ratones. El rendimiento del comportamiento motor promedio de grupo diario para los ratones que recibieron la dosificación de 20 mg/kg de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA se muestra para la prueba de barra giratoria (figura 16) y para la prueba de varilla colgante (figura 19), en las que un tiempo latente más prolongado hasta la caída en relación con el control indica rendimiento motor mejorado. El rendimiento en barra de equilibrio promedio de grupo diario para la dosificación de 20 mg/kg se muestra en la figura 21, en la que una puntuación mayor en relación con el control indica rendimiento motor mejorado. El rendimiento de comportamiento motor continuó mejorando con la dosificación creciente a lo largo de los intervalos estudiados, tal como se muestra para la prueba de barra giratoria para los regímenes de tratamiento tanto preventivo (figura 17) como terapéutico después de 3 días (figura 18), y para la prueba de varilla colgante (figura 20) y la prueba de barra de equilibrio (figura 22) para todas las dosis y regímenes de tratamiento.

Los resultados del análisis de contenido en cerio mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de cortes de órganos y cerebro aislados de ratones tratados con nanoceria con AC/EDTA se muestran en las figuras 23-24, indicando que el cerio se acumuló más en el cerebelo para los regímenes de tratamiento tanto preventivo como terapéutico.

Se estudiaron los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cortes cerebrales preparados a partir del cerebelo de ratones a los que se había inducido para que desarrollaran EAE (síntomas crónicos-progresivos de EM), habiéndose preparado los cortes 1 semana tras la inyección de nanoceria con AC/EDTA final ( $n = 12$  ratones). Se midieron los niveles de ROS usando la sonda fluorescente CM-DFCDA (Invitrogen), usando métodos descritos en Estevez, AY; *et al.*, Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia, *Free Radic. Biol. Med.* (2011)51(6): 1155-63 (doi:10.1016/j.radbiomed. 2011.06.006).

Los niveles intracelulares de ROS disminuyeron significativamente en cortes cerebrales de ratones tratados con nanoceria con AC/EDTA en comparación con animales control y tratados con fingolimod, cuando se sometieron a prueba 7 días tras el último tratamiento con fármaco (figuras 25-26).

No se ha notificado anteriormente la distribución amplia y uniforme de nanoceria en tejidos de parénquima cerebral de un mamífero vivo, cuando se obtenían imágenes con una resolución micrométrica o submicrométrica. Para este fin, la distribución amplia de partículas de nanoceria con AC/EDTA por todo el tejido cerebral de ratón se indica por la naturaleza difusa y uniforme de los niveles disminuidos de fluorescencia de ROS (CM-DFCDA) evidentes en cortes cerebelares tomados de un animal tratado con nanoceria con AC/EDTA y control relacionado no tratado (figura 27). En particular, se observó que la distribución de fluorescencia en el corte tratado con nanoceria (figura 27) no se corresponde con la distribución de microvasculatura cerebelar representada a una escala de ampliación

similar en la figura 28, lo que sugiere que las partículas de nanocería con AC/EDTA no se limitan a los vasos microvasculares ni quedan atrapadas en las células de la barrera hematoencefálica, sino que se distribuyen ampliamente por todo el tejido cerebelar. Estas observaciones concuerdan con la penetración de partículas de nanocería con AC/EDTA a través de la barrera hematoencefálica comprometida de ratones con EAE a los que se había inducido esclerosis múltiple crónica-progresiva, y con que las partículas se dispersaran ampliamente en los tejidos cerebrales.

Esclerosis múltiple con recaída/remisión

10 Modelo de EAE murino de esclerosis múltiple

Muchas de las características patológicas de la aparición de EM se modelan mediante el modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) murino, en el que se induce un trastorno inflamatorio mediante inmunización con antígenos de mielina. El modelo de EAE se caracteriza por la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE), infiltración perivascular de células inmunitarias, activación de microglía y desmielinización. El modelo de EAE ha sido crítico en el desarrollo de terapias actuales en el tratamiento de la EM.

Se trataron ratones SJL-EAE hembra con vehículo, vehículo más nanopartículas de ceria con AC/EDTA o vehículo más nanocería comercial obtenida de Sigma-Aldrich o Alfa Aesar. Se dispersó la nanocería obtenida comercialmente en un vehículo con sonicación justo antes de su uso. En el diseño de dosificación preventiva, se inyectaron i.v. en la vena de la cola de los ratones 10 mg/kg de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA el día antes de la inducción de la enfermedad y el día de la inducción de la enfermedad, seguido por inyecciones de 6 mg/kg de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA en los días 3, 7, 14 y 21 tras la inducción de la enfermedad. El diseño de dosificación terapéutica fue similar excepto en que se eliminaron las dos primeras inyecciones (antes de y en el día de inducción de la enfermedad). Las nanopartículas de ceria con AC/EDTA se mezclaron en un vehículo de PBS/solución salina con citrato de sodio 50 mM antes de la administración.

Se indujo encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) a los ratones, es decir, síntomas similares a la esclerosis múltiple con recaída/remisión, tal como sigue: a una inyección intravenosa en la cola de 0,1 ml de 200 µg de péptido de proteína básica de mielina (PLP139-151) disuelta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, le siguió una inyección intraperitoneal de 0,1 ml de 200 ng de toxina pertúsica en PBS en el día 0 y el día 2.

Tras la inducción de la enfermedad, los ratones desarrollaron el primer episodio de parálisis a los 11-14 días (máximo a los 14 días) tras la inmunización y, de manera similar a la mayoría de los pacientes humanos con EM, se recuperaron completamente o casi completamente de esta primera aparición de parálisis aproximadamente en el día 20.

Las pruebas incluyeron la puntuación clínica diaria junto con las tres pruebas de comportamiento motor diseñadas para evaluar la función cerebelar (barra de equilibrio), fuerza de las extremidades delanteras (varilla colgante) y fuerza de las extremidades traseras (barra giratoria), tal como se describió anteriormente.

En cuanto a la aparición de la enfermedad, se observó un retraso sustancial (mejora) en las siguientes pruebas: resultados de la puntuación clínica para los diseños de dosificación tanto preventiva como terapéutica (figura 29), resultados de la barra de equilibrio para el diseño de dosificación preventiva (figura 30) y en la varilla colgante, resultados para los diseños de dosificación preventiva y terapéutica (figura 31). En la tabla 6 se tabula un resumen estadístico de los efectos cuantitativos (promedio) de las nanopartículas de ceria con AC/EDTA administradas mediante los diseños de dosificación preventiva y terapéutica en comparación con controles con vehículo. Se muestran mejoras estadísticamente significativas para la puntuación clínica y para cada una de las pruebas de comportamiento motor para los diseños de dosificación preventiva y terapéutica, excepto para el caso del diseño de dosificación preventiva para la prueba de barra giratoria.

Tabla 6

Modelo de PLP	Puntuaciones clínicas máximas	Latencia hasta la caída máxima en barra giratoria	Latencia hasta la caída máxima en varilla colgante	Puntuación en barra de equilibrio
Control (n = 20) frente a preventivo (u = 8)	$\bar{x} 1,7 \pm 0,2$ EE $\bar{x}$ $0,9 \pm 0,3$ EE p = 0,048	$\bar{x} 318 \pm 10$ EE $\bar{x}$ $27,1 \pm 5,6$ EE p = 0,799	$\bar{x} 63,3 \pm 17$ EE $\bar{x}$ $158,7 \pm 39$ EE p = 0,001*	$\bar{x} 1,8 \pm 0,4$ EE $\bar{x}$ $4,1 \pm 0,58$ EE p = 0,005*
Control (n = 20) frente a preventivo (n = 12)	$\bar{x} 1,7 \pm 0,2$ EE $\bar{x}$ $0,9 \pm 0,25$ EE p = 0,038*	$\bar{x} 33,8 \pm 1,10$ EE $\bar{x} 100,8 \pm 16$ DE p = 0,003*	$\bar{x} 63,3 \pm 17$ EE $\bar{x}$ $146,6 \pm 37$ EE p = 0,001*	$\bar{x} 1,8 \pm 0,4$ EE $\bar{x}$ $3,1 \pm 0,63$ EE p = 0,005*

55 La comparación de las puntuaciones clínicas promedio (AUC) a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo

de recaída/remisión de EM indica que en relación con el control, sólo las nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) mejoran la enfermedad (figura 33). Los resultados para comparaciones de Sigma-Aldrich y Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) o bien son peores o bien no son diferentes del control.

5 La comparación de la puntuación promedio de barra de equilibrio a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM indica que las nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) funcionaron mejor, mientras que, con la excepción de la dilución 1:9 de Alfa Aesar, las comparaciones o bien fueron peores o bien no fueron diferentes del control (figura 34).

10 La comparación de los resultados promedio de la prueba de varilla colgante a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM indica que en relación con el control, sólo las nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) mejoran la enfermedad aumentando el tiempo de latencia hasta la caída media (figura 35). Los resultados para las comparaciones de Sigma-Aldrich y Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) o bien son peores o bien no son diferentes del control.

15 La comparación de los resultados promedio de la prueba de barra giratoria a lo largo del curso de la enfermedad para el modelo de recaída/remisión de EM indica que en relación con el control, sólo las nanopartículas de ceria con AC/EDTA (CNRx 87) mejoran la enfermedad aumentando el tiempo de latencia hasta la caída media (figura 36). Los resultados para las comparaciones de Sigma-Aldrich y Alfa Aesar (diluciones 1:14 y 1:9) son peores que para el control.

#### Comparación de los niveles cerebrales de cerio

25 Usando el diseño de dosificación terapéutica, ratones a los que se indujo EAE (n=12) recibieron inyecciones en la vena de la cola de dispersiones de ceria (dosificación total de 24 mg/kg) que comprendían las nanopartículas de ceria con AC/EDTA o una nanoceria disponible comercialmente (es decir, obtenida de Sigma-Aldrich y Alfa Aesar). Veinticuatro horas tras la última inyección, se recogieron los cerebros y otros órganos y se determinó la concentración de ceria en estos órganos usando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

30 Los resultados de la deposición en el cerebro mostrados en la figura 37, indican que el cerio estaba por debajo del límite de detección para la nanoceria de Sigma-Aldrich, mientras que la deposición en el cerebro de la realización de nanoceria CNRx de la invención es aproximadamente 4 veces mayor que la de los materiales de Alfa Aesar. En un estudio de biodistribución separado, se inyectó en la vena de la cola a cuatro ratones SJL adultos con edades comprendidas entre 1-3 meses que poseían la característica de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) 52 mg de nanoceria con AC/EDTA por kg de masa corporal de ratón (dosificación de 52 mg/kg) en solución salina en tres puntos de tiempo: día 0, día 3 y día 7. Además, se indujo en dos de estos ratones el desarrollo de síntomas similares a la esclerosis múltiple (EM) (encefalomiелitis autoinmunitaria experimental) mediante la inyección de proteína protolipídica (PLP) en el día 0, y demostraron síntomas similares a la EM máximos hacia el día 7. En los otros dos ratones no se indujo el desarrollo de síntomas similares a la EM, sino que simplemente se les inyectó solución salina como control con vehículo. En el día 8 (24 horas tras la última inyección de nanoceria) se sacrificó a cada uno de los cuatro animales; y se les extirparon los órganos del corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo, cerebro y médula espinal, se congelaron y se sometieron a análisis del contenido en cerio.

45 Se analizaron los órganos para determinar el contenido en cerio en masa usando espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) mediante los procedimientos siguientes. Se digirió una muestra de tejido de 0,1-0,5 g de cada uno de los órganos con 1 ml de HNO<sub>3</sub> óptimo en un tubo de polipropileno de 15 ml, y se calentó hasta 105°C durante 30 minutos en un horno microondas para digestión. Se dejó que la muestra se enfriara, se añadieron 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se diluyó la muestra hasta un volumen final de 10 ml final con agua desionizada. Se analizaron estas muestras digeridas para determinar el contenido en cerio en masa mediante ICP-MS (7500cx, Agilent, Santa Clara, CA) que se hizo funcionar en modo normal. Se calibró el instrumento con patrones primarios rastreables de NIST y se usó un segundo patrón fuente como comprobación de calibración.

55 La tabla 5 mostrada a continuación contiene los resultados del contenido en cerio en masa para los cuatro ratones (etiquetados como ratón 1-4) lo que constituye el estudio de biodistribución descrito en el presente documento como realizaciones de la invención. Además, se incluyen para comparación los resultados de estudios de biodistribución anteriores en todo el animal (roedor) de nanoceria administrada por vía intravenosa notificados por Yokel *et al.* Nanotoxicology 3(3), 234-248 (2009) (datos tomados de la tabla I en ese documento), y Hardas *et al.* Toxicological Sciences 116(2), 562-576 (2010) (datos tomados para el sacrificio a las 20 h de la tabla 2 en ese documento).

Tabla 5

Estudio	Dosificación (mg/kg)	EM inducida	Contenido en cerio en masa (mg/kg)					
			Cerebro	Corazón	Riñón	Hígado	Pulmón	Bazo
Yokel <i>et al.</i>	50		1	-	-	610	-	2828

Hardas <i>et al.</i>	100		0,6	-	-	1007	-	2885
Ratón 1	52	Sí	28	767	3798	30028	1316	17762
Ratón 2	52	Sí	42	1304	6985	31609	1419	17090
Ratón 3	52	No	70	1325	3343	26141	1807	18814
Ratón 4	52	No	59	1241	4431	25567	6303	21655

La comparación del contenido en cerio en masa entre los estudios descritos en el presente documento (ratones 1-4) y los estudios anteriores realizados con dosificación comparable o superior (Yokel *et al.* y Hardas *et al.*) indica que se asocia aproximadamente 30-100 veces más cerio con el cerebro, se asocia aproximadamente 25-50 más cerio con el hígado y se asocia aproximadamente 7 veces más cerio con el bazo como resultado de inyectar la dispersión acuosa de nanopartículas de ceria con AC/EDTA de 2,5 nm de diámetro descritas en el presente documento como realización de la invención. Además, se indica que el sorprendente gran aumento en las cantidades de cerio asociado con los diversos órganos se observa tanto en ratones sanos (ratones 3-4) que poseen una BHE completamente intacta, así como en los ratones con síntomas inducidos similares a EM (ratones 1-2) que se espera que tengan una BHE sustancialmente comprometida.

Se indica que las diferencias entre los protocolos de biodistribución empleados en los estudios descritos en el presente documento (ratones 1-4) y los estudios anteriores realizados con dosificación comparable o superior (Yokel *et al.* y Hardas *et al.*) fueron en general bastante pequeñas en comparación con los grandes aumentos en el cerio asociado con los diversos órganos objetivo como resultado de esta realización de la invención. Específicamente, Yokel *et al.* usaron una dosis de 50 mg/kg y sacrificaron los animales 20 horas tras la inyección final. Hardas *et al.* usaron una dosis de 100 mg/kg y también sacrificaron los animales 20 horas tras la inyección final, y los inventores en el presente documento usaron una dosis a 52 mg/kg y sacrificaron los animales 24 horas tras la inyección final.

#### Estudios de biopersistencia

En puntos de tiempo diferentes (1-21 días) desde la última inyección de nanopartículas de ceria con AC/EDTA (dosificación total de 24 mg/kg), se recogieron cerebros de ratones a los que se había inducido la recaída/remisión de EAE- (n=22) y se determinó la concentración de cerio usando ICP-MS. Fueron detectables niveles significativos de ceria hasta al menos 3 semanas tras la última inyección (figura 38).

A partir de estudios realizados en ratas, tras una única inyección intravenosa de 10 mg/kg o una única inyección subcutánea de 50 mg/kg, las mediciones del contenido en cerio en la sangre de las ratas indican que las nanopartículas de ceria con AC/EDTA se eliminaban rápidamente del plasma sanguíneo (figura 39).

#### Estudios de toxicidad

No se observó genotoxicidad para la realización de nanopartículas de ceria con AC/EDTA cuando se evaluaron mediante el ensayo con Green-Screen de Gentronix Ltd. (RU).

No se observó toxicidad por fosfolipidosis para la realización de nanopartículas de ceria con AC/EDTA cuando se evaluó mediante el ensayo de fosfolipidosis (PLD) de Gentronix Ltd. (RU).

No se observó interferencia con los canales de potasio para la realización de nanopartículas de ceria con AC/EDTA cuando se evaluó mediante el ensayo de hERG-450 de Gentronix Ltd. (RU).

#### Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad de las neuronas motoras, progresiva, mortal producida por la degeneración de neuronas superiores e inferiores ubicadas en el asta anterior de la médula espinal y las neuronas corticales que proporcionan su entrada eferente. El estado a menudo se denomina enfermedad de Lou Gehrig, tras el jugador de beisbol al que diagnosticó la enfermedad en 1939.

Aunque se desconoce la causa de la ELA, el descubrimiento de que la ELA familiar está relacionada con mutaciones en el gen que produce la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), un poderoso antioxidante, sugiere que puede estar implicada la acumulación de radicales libres. Sin embargo los ratones que carecen del gen de SOD1 no desarrollan habitualmente ELA familiar, sino que más bien presentan un aumento en la atrofia muscular relacionada con la edad (sarcopenia).

Se sometieron ratones SOD1<sup>G93A</sup> obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.; variedad B6SJL-TgSOD1<sup>G93A</sup>) a pruebas de comportamiento motor y clínicas semanales (descritas anteriormente) y se aleatorizaron a grupos de tratamiento en el momento de la aparición de la enfermedad. Un grupo de ratones recibió inyecciones de control con vehículo de solución salina solo, mientras que a los animales tratados con nanocería se les administraron inyecciones en la vena de la cola de nanopartículas de ceria con AC/EDTA de 16 mg/kg o bien una

vez al día o bien dos veces por semana.

- 5 Ratonés G93A macho que recibieron el tratamiento con nanocería presentaron mejoras muy sustanciales en todas las pruebas de habilidad motora (varilla colgante, barra de equilibrio y barra giratoria). Los ratones G93A macho que recibieron el tratamiento de nanopartículas de ceria con AC/EDTA también mostraron una prolongación de la vida en relación con el control, mostrado en la figura 40.

Lesión por isquemia-reperfusión

- 10 Lesión por perfusión se refiere al daño tisular que se produce cuando el riego sanguíneo vuelve al tejido tras un periodo de isquemia. La ausencia de oxígeno y nutrientes procedentes de la sangre durante el periodo isquémico crea un estado en el que el restablecimiento de la circulación da como resultado inflamación y daño oxidativo a través de la inducción de estrés oxidativo en lugar del restablecimiento de la función metabólica normal.
- 15 Se cree que la respuesta inflamatoria media parcialmente el daño de lesión por perfusión. Los glóbulos blancos llevados a la zona por sangre recién retornada pueden liberar una variedad de factores inflamatorios, incluyendo interleucinas y radicales libres.

- 20 En una demostración de lesión por isquemia-reperfusión cardíaca murina, se inyectó a ratones vehículo o nanopartículas de ceria con AC/EDTA a una dosificación de 20 mg/kg en los días -4 y -2 a través de la vena yugular. En el día 0 se extirparon los corazones y se perfundieron en un sistema de Langendorff. Se monitorizó la muerte celular necrótica mediante el ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH), tras 25 min de isquemia sin flujo global y una perfusión de 45 min. La figura 41 muestra una mejora en la forma de reducción en la acumulación de LDH para el tratamiento con nanopartículas de ceria con AC/EDTA en relación con el control con vehículo. La evaluación del tamaño del infarto cardíaco también sugiere que la dosis de 20 mg/kg de nanopartículas de ceria con AC/EDTA proporcionó un efecto protector.
- 25

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de una dispersión de nanopartículas, que comprende:
  - 5 a. formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido cítrico y ácido etilendiaminatetraacético en una razón molar que oscila entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 0,1, un oxidante y agua; y
  - b. formar directamente, sin aislamiento, una dispersión de nanopartículas que contienen cerio.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dichas nanopartículas que contienen cerio son sustancialmente cristalinas.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dichas nanopartículas se **caracterizan por** una estructura de cristal de fluorita cúbica.
- 15 4. Método según la reivindicación 1, que comprende además calentar o enfriar la mezcla de reacción para mantener una temperatura de reacción menor que la temperatura de ebullición del agua.
- 20 5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho oxidante comprende aire, oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno.
6. Método según la reivindicación 1, en el que dichas nanopartículas que contienen cerio son sustancialmente no aglomeradas.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que más de aproximadamente el 95 por ciento de dichas nanopartículas que contienen cerio son no aglomeradas.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicha dispersión de nanopartículas que contienen cerio tiene un potencial zeta que oscila entre aproximadamente -15 mV y aproximadamente -30 mV.
- 30 9. Método según la reivindicación 1, en el que dicha dispersión es estable durante al menos 2 meses.
10. Composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen cerio preparadas mediante el método según la reivindicación 1.
- 35 11. Composición farmacéutica que comprende una dispersión de nanopartículas que contienen cerio obtenidas mediante el método según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente para prevenir una enfermedad relacionada con estrés oxidativo o un acontecimiento relacionado con estrés oxidativo.
- 40 12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que dicha enfermedad o acontecimiento relacionado con estrés oxidativo es accidente cerebrovascular isquémico, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión por isquemia-reperusión.
- 45 13. Composición farmacéutica que comprende una dispersión de nanopartículas que contienen cerio obtenidas mediante el método según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un síntoma de una enfermedad relacionada con estrés oxidativo o un acontecimiento relacionado con estrés oxidativo en un paciente.
- 50 14. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en la que dicha enfermedad o acontecimiento relacionado con estrés oxidativo es accidente cerebrovascular isquémico, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica o lesión por isquemia-reperusión.
- 55 15. Nanopartícula preparada mediante el método según la reivindicación 1.

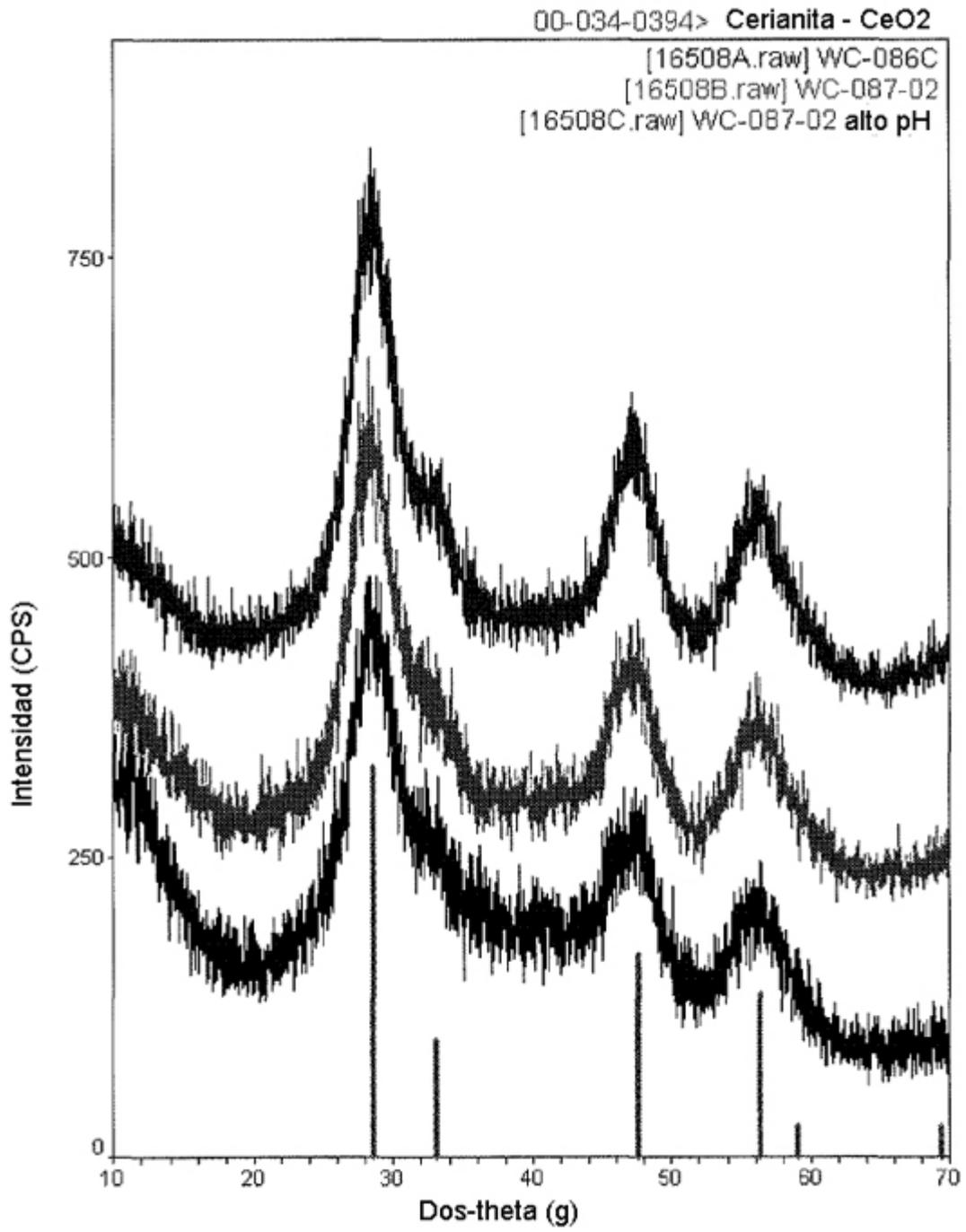


FIG. 1

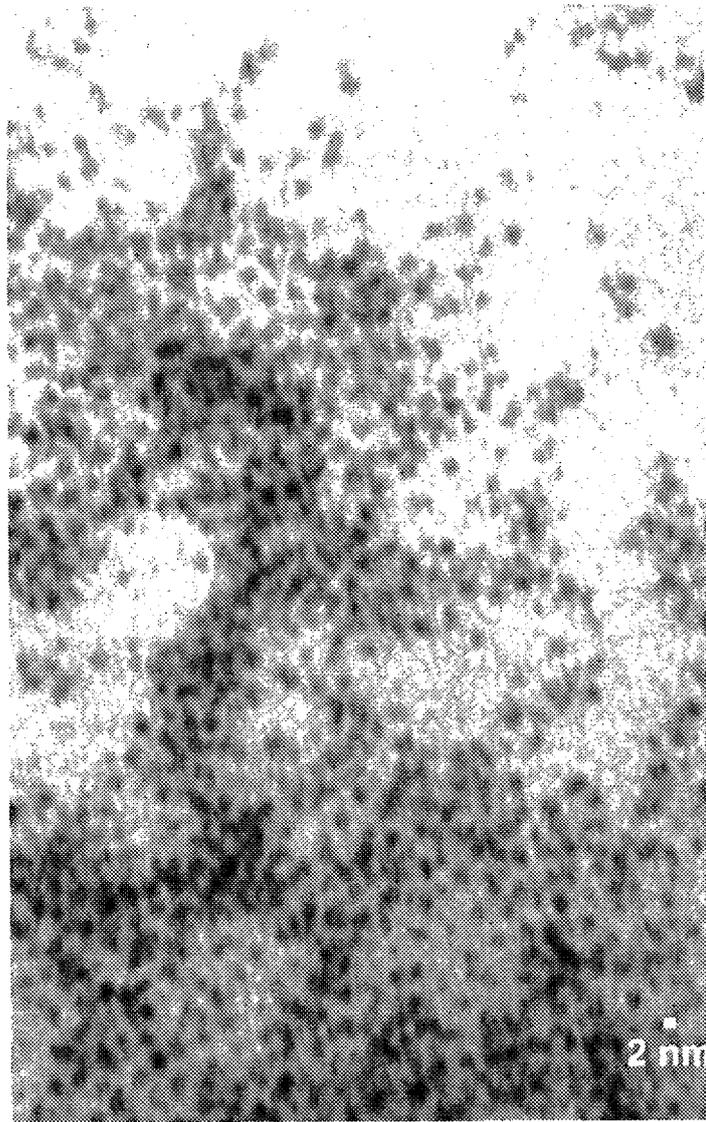


FIG.2

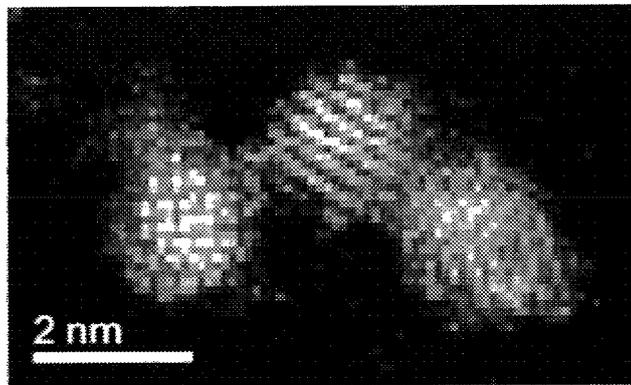


FIG. 3

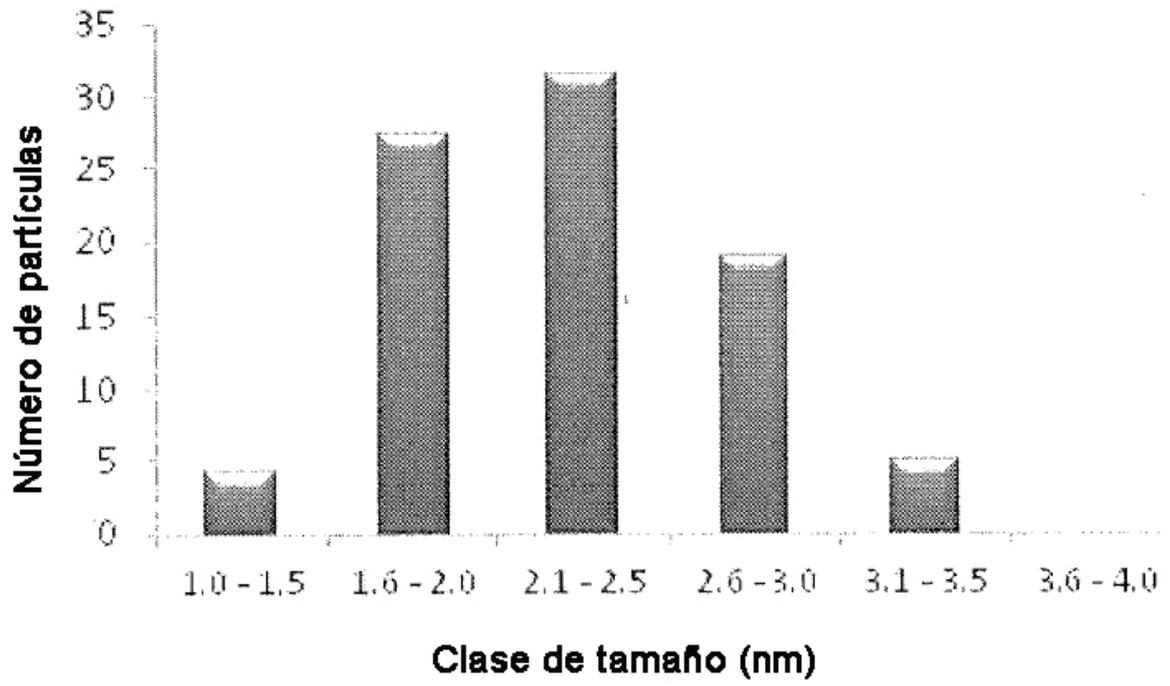


FIG. 4

Tratamiento preventivo con 10 mg/kg de MOG

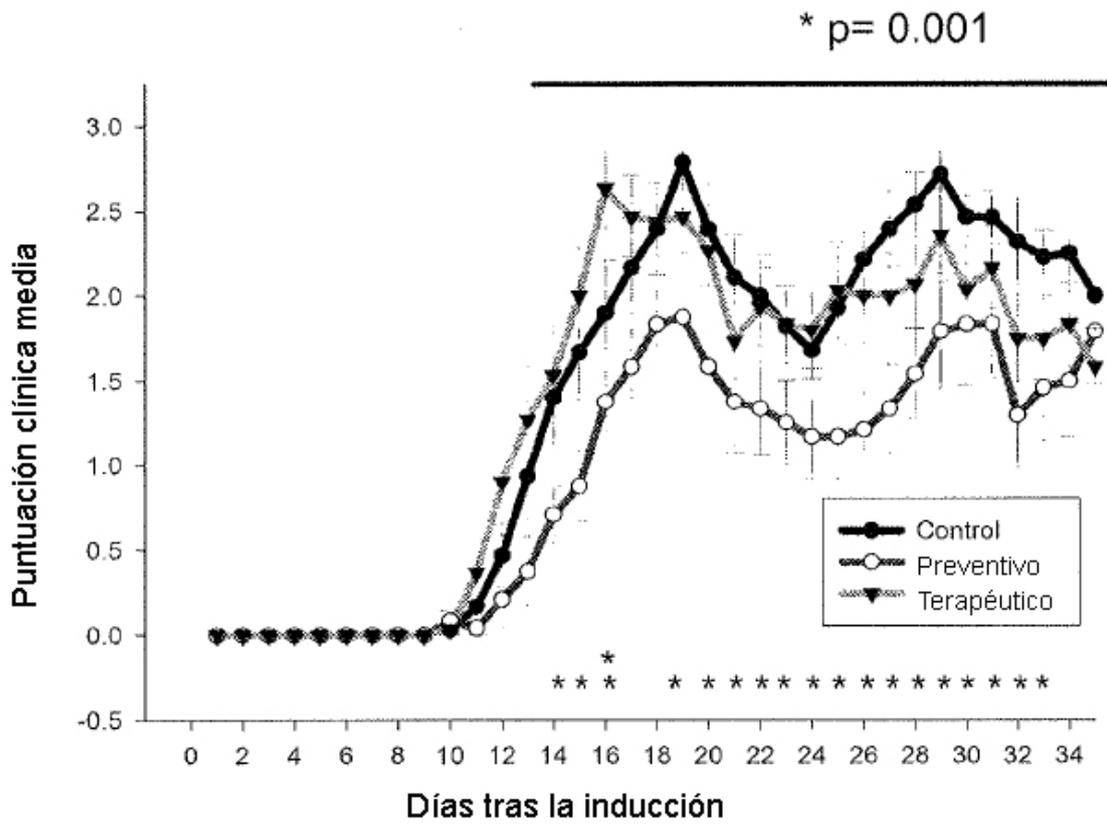


FIG. 5

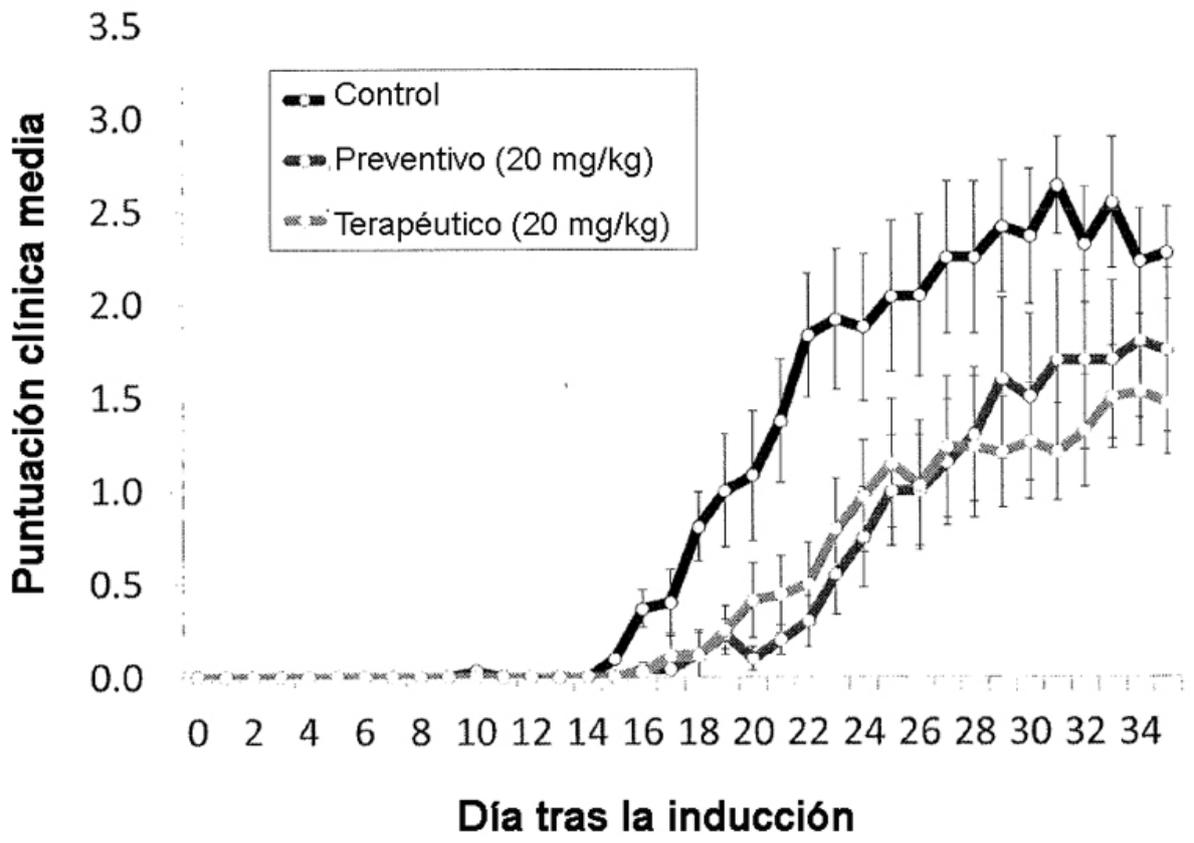


FIG. 6

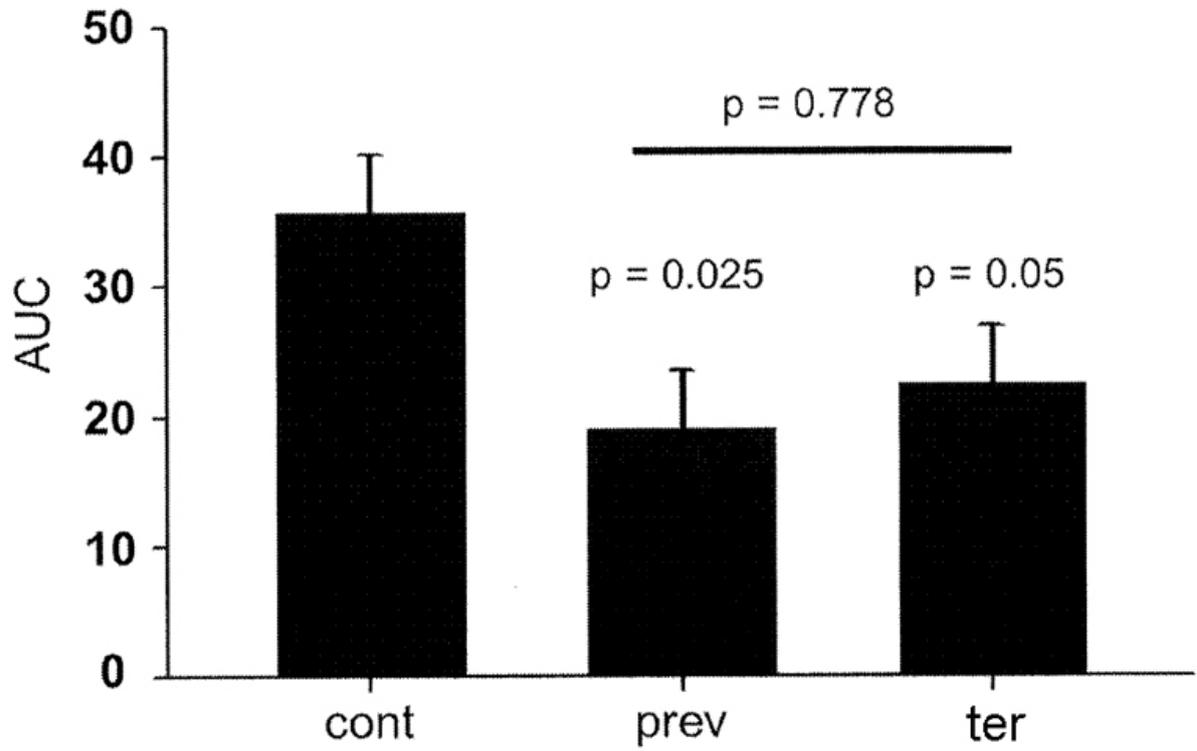


FIG. 7

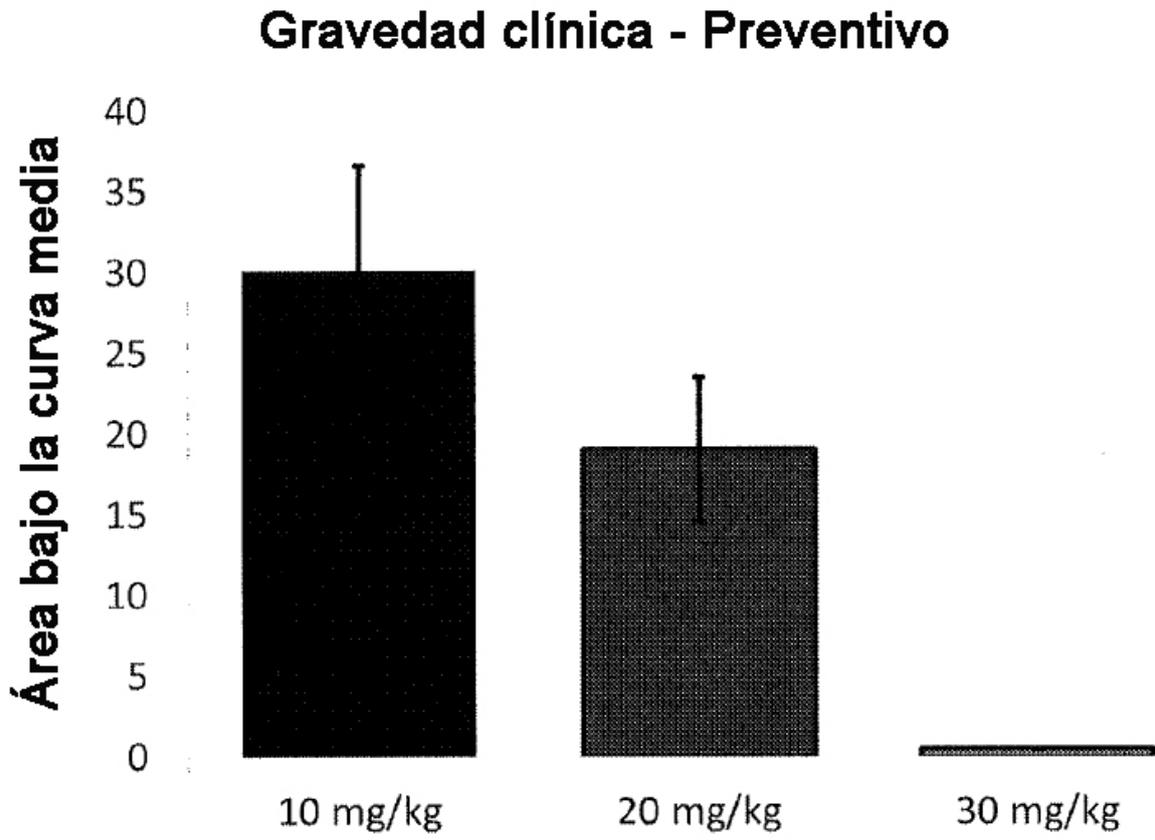


FIG. 8

### Gravedad clínica - Después de 3 días

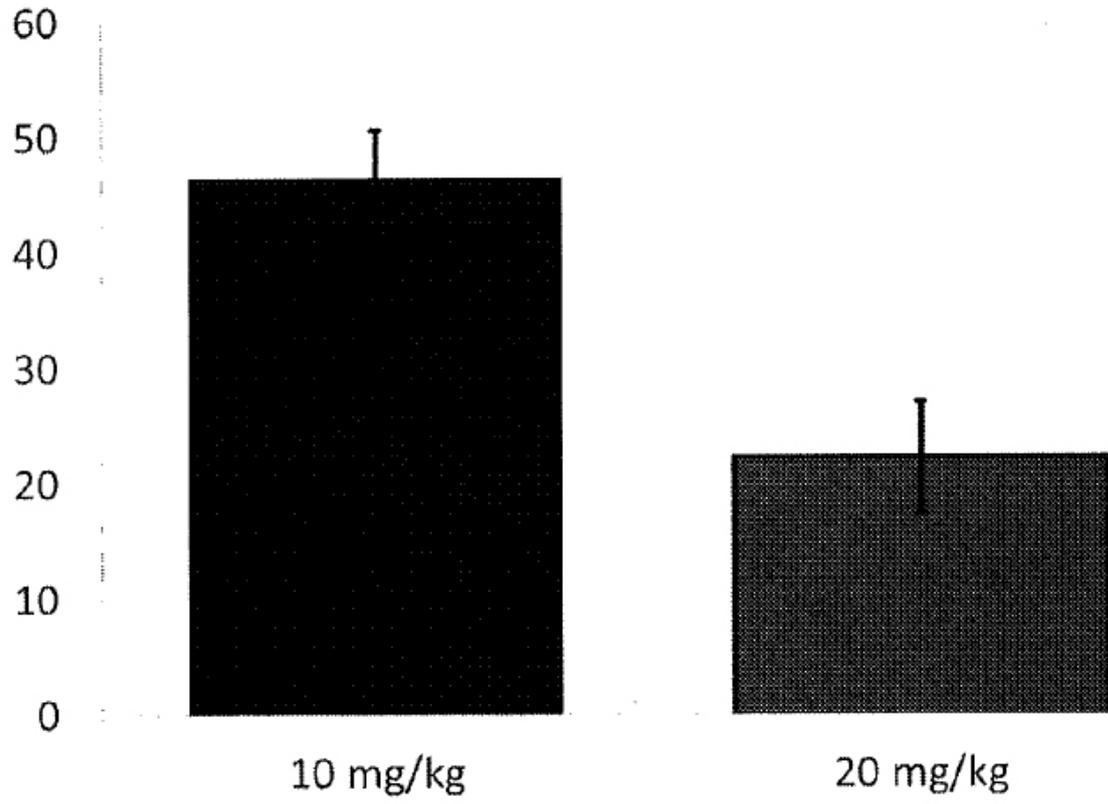


FIG. 9

### Reducción en la gravedad de la enfermedad en función de la ceria total inyectada

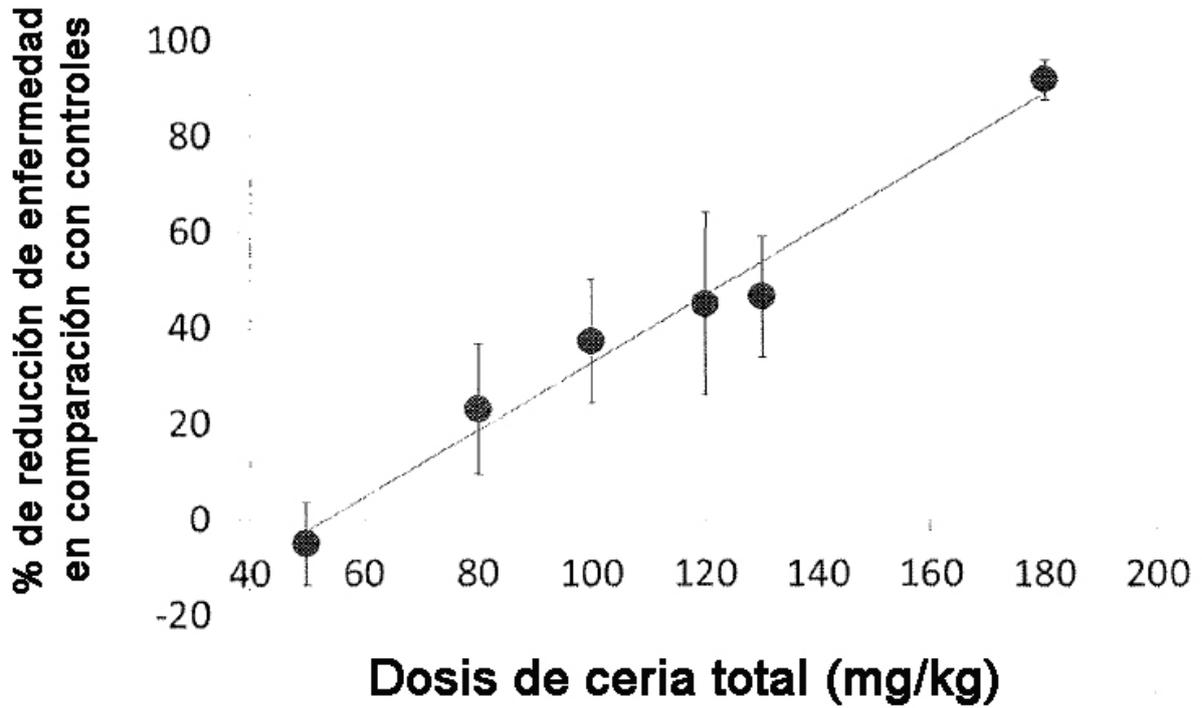


FIG. 10

**Contenido en ceria del cerebro en función de la ceria total inyectada**

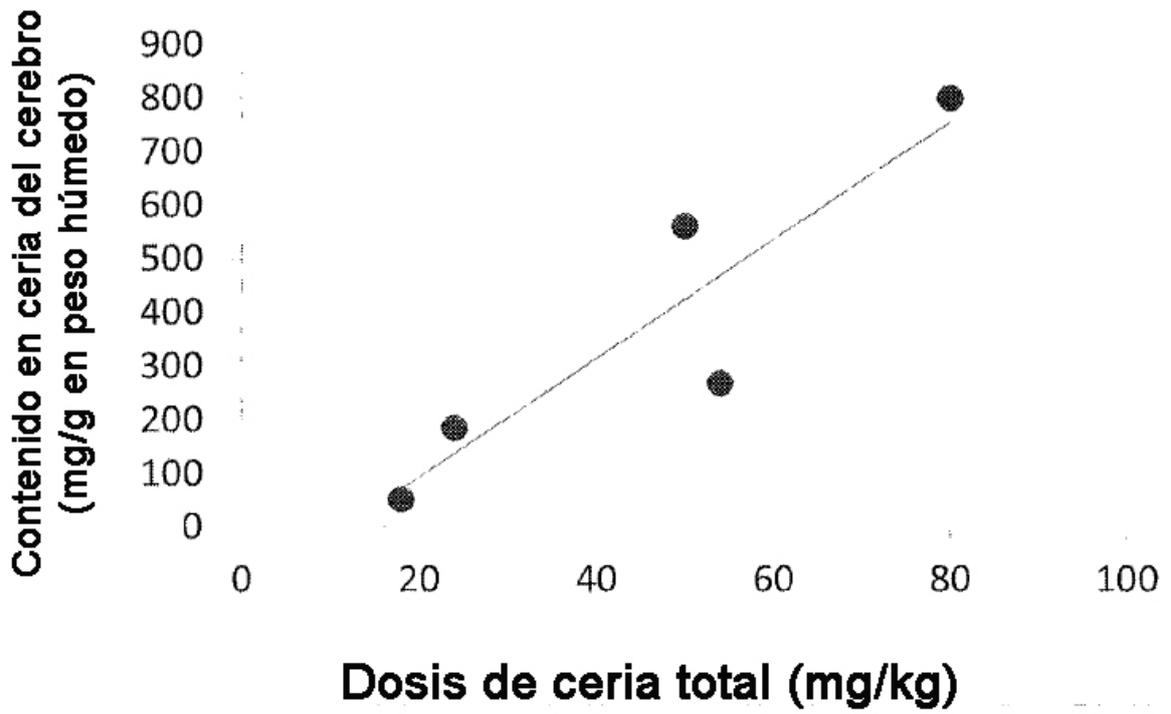


FIG. 11

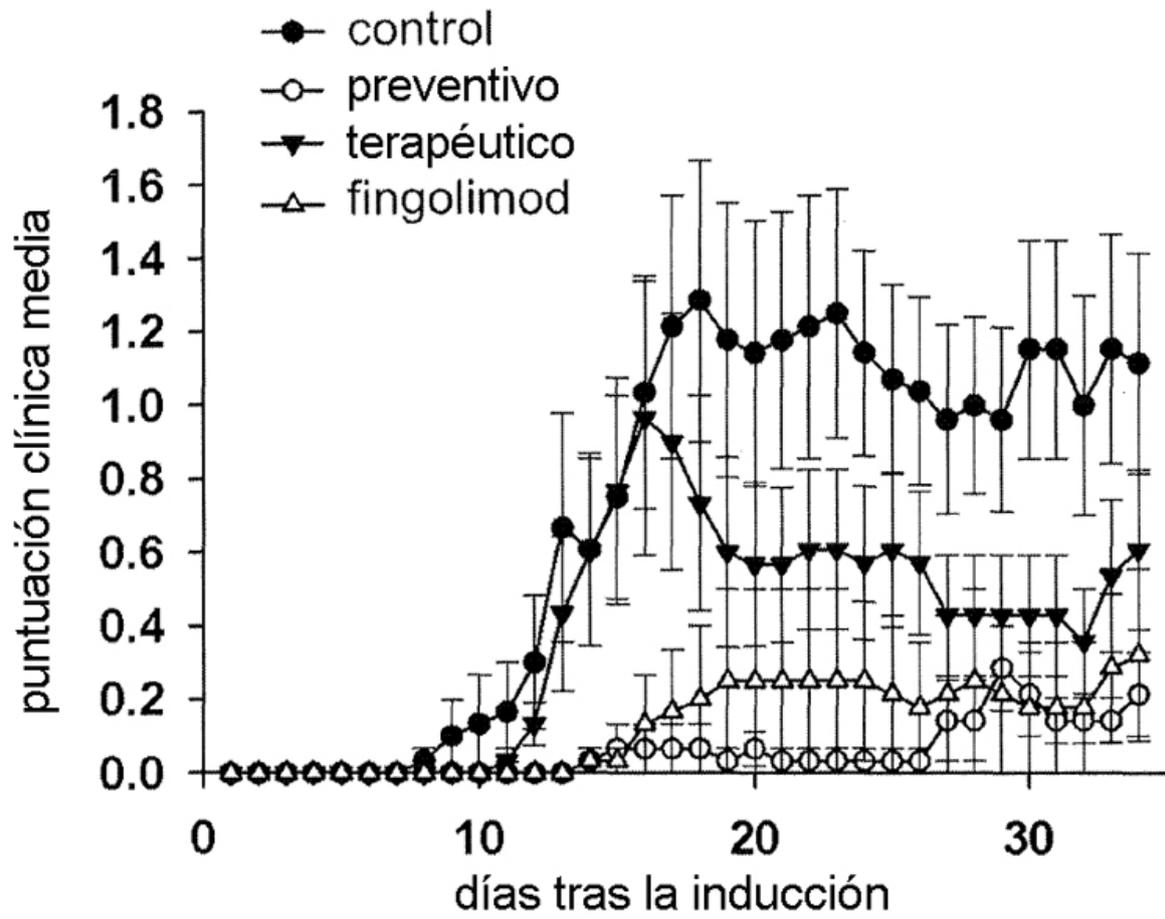


FIG. 12

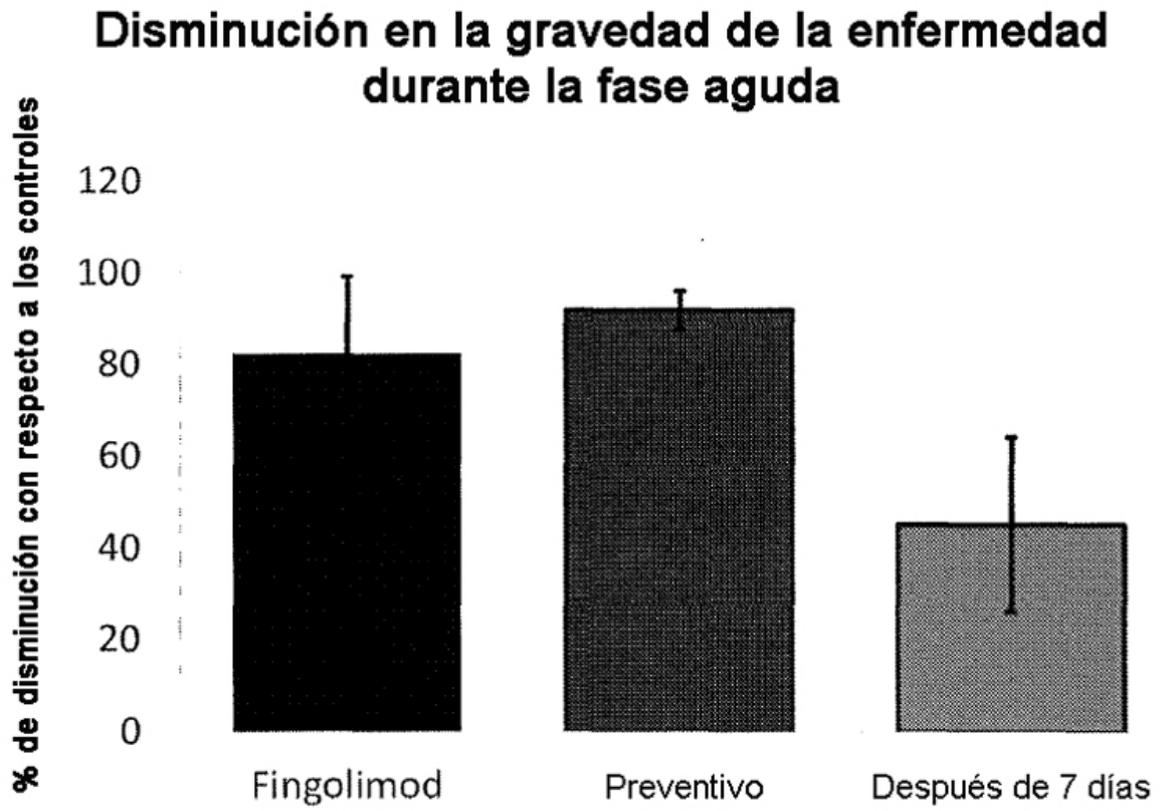


FIG. 13

**Disminución en la gravedad de la enfermedad durante la fase crónica**

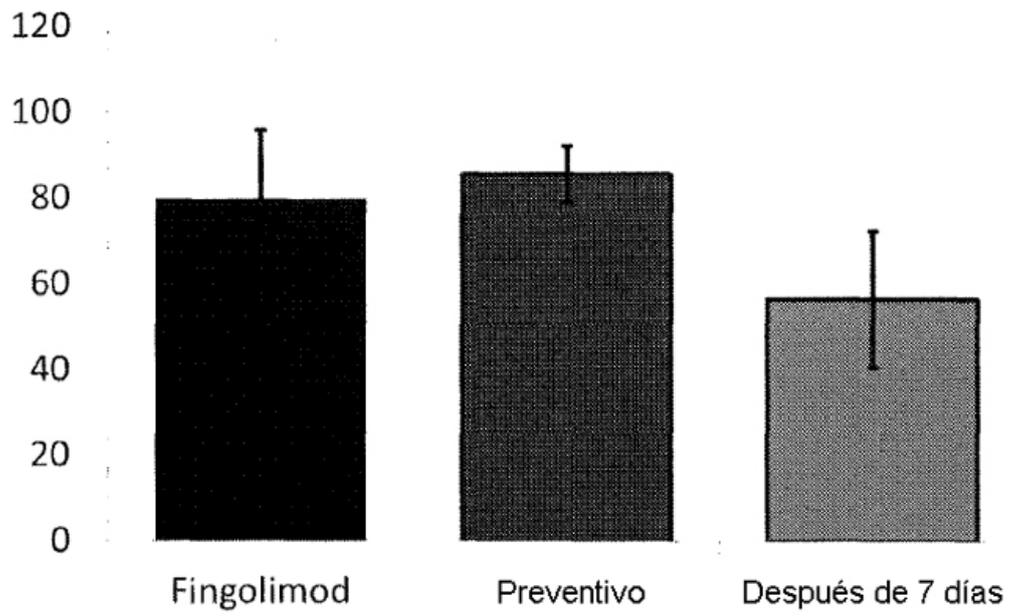


FIG. 14

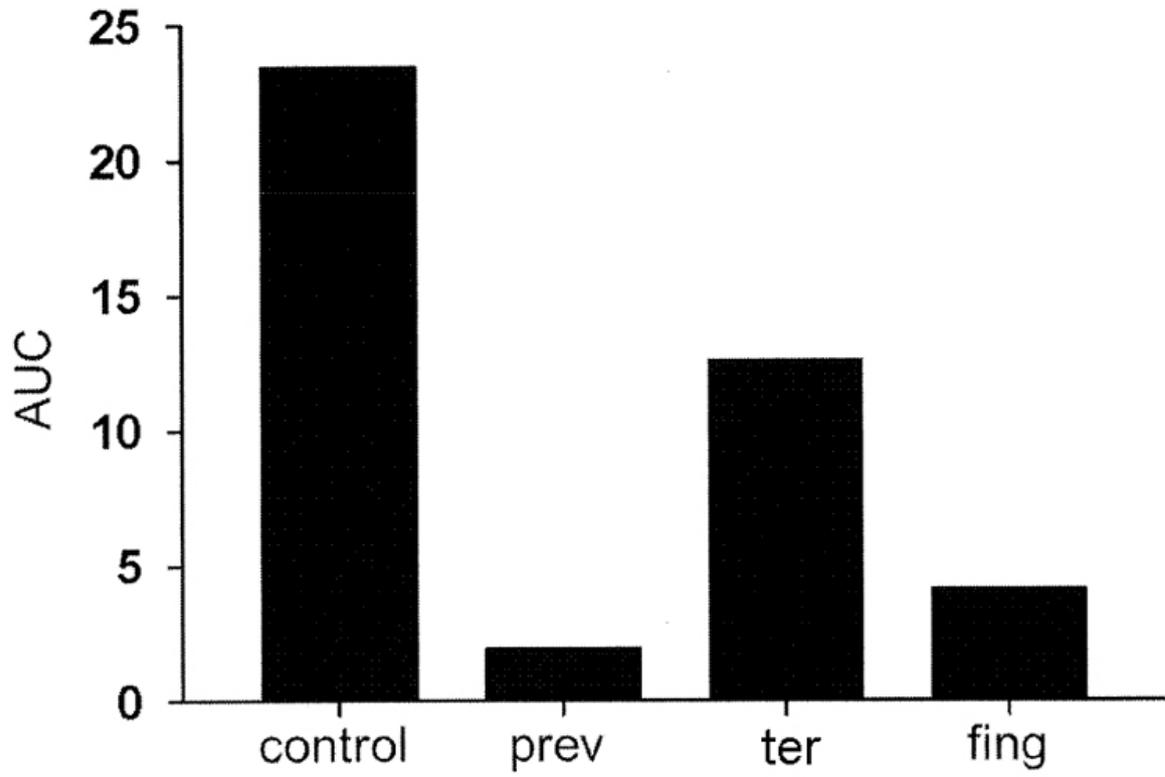


FIG. 15

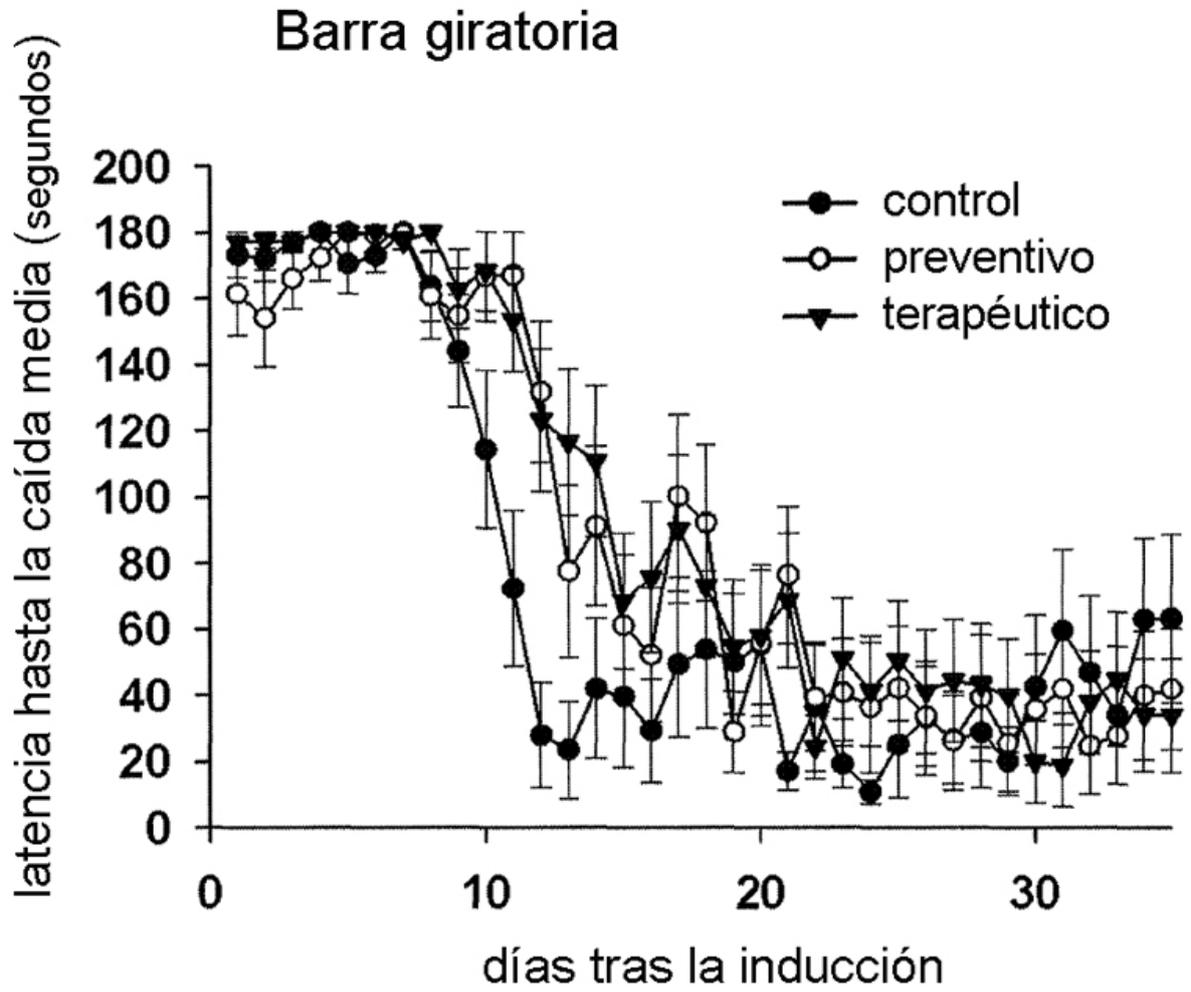


FIG. 16

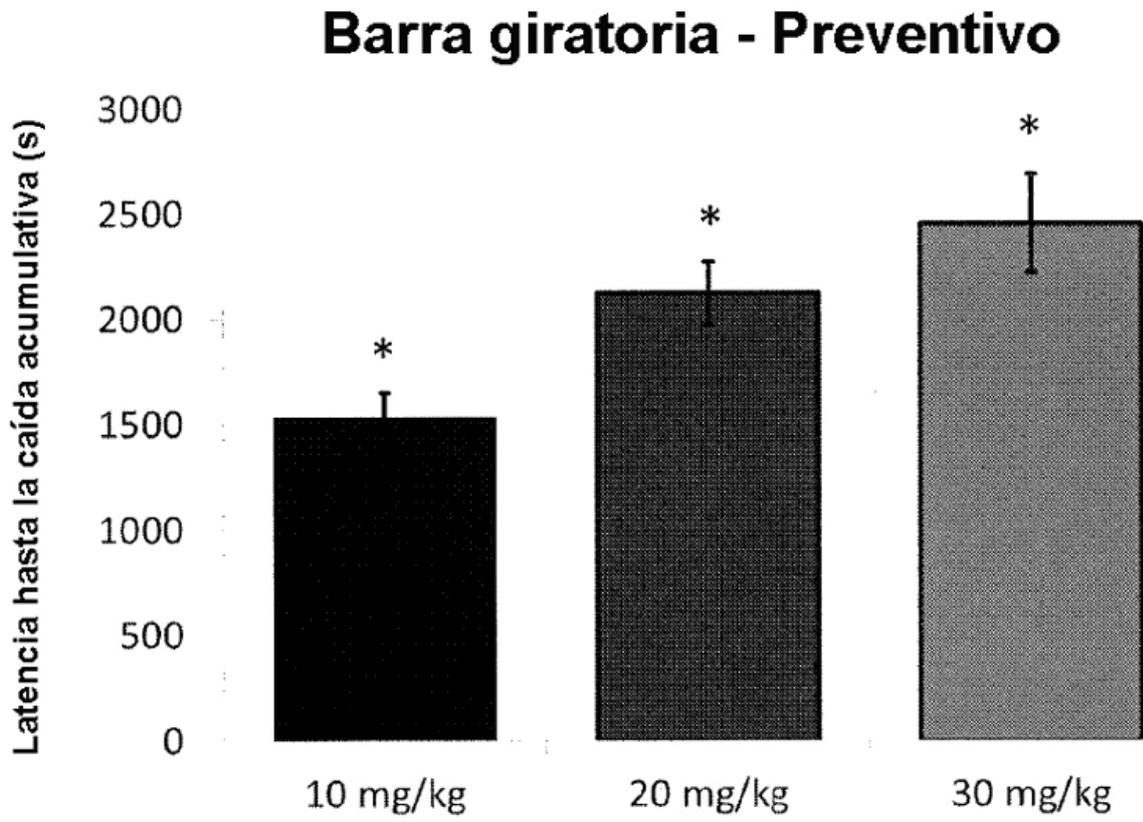


FIG. 17

### Barra giratoria - Después de 3 días

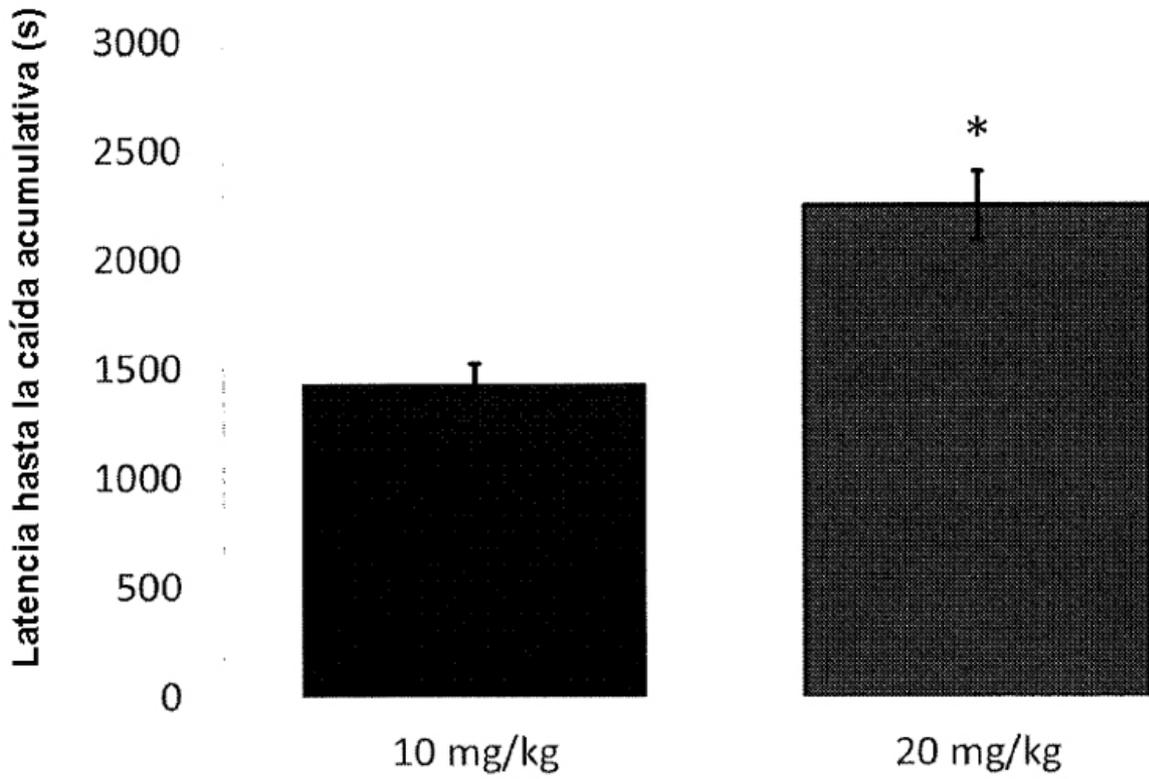


FIG. 18

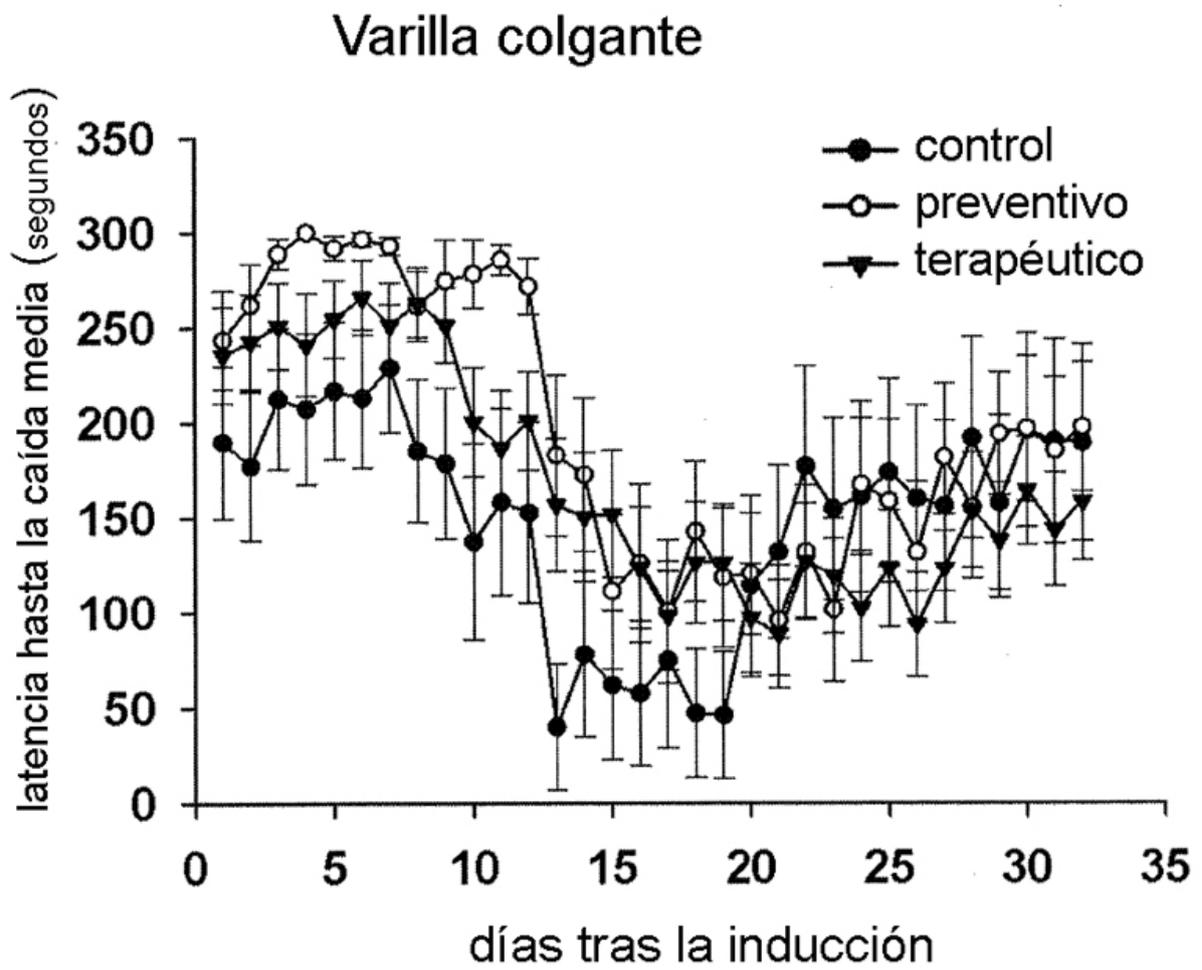


FIG. 19

### Varilla colgante

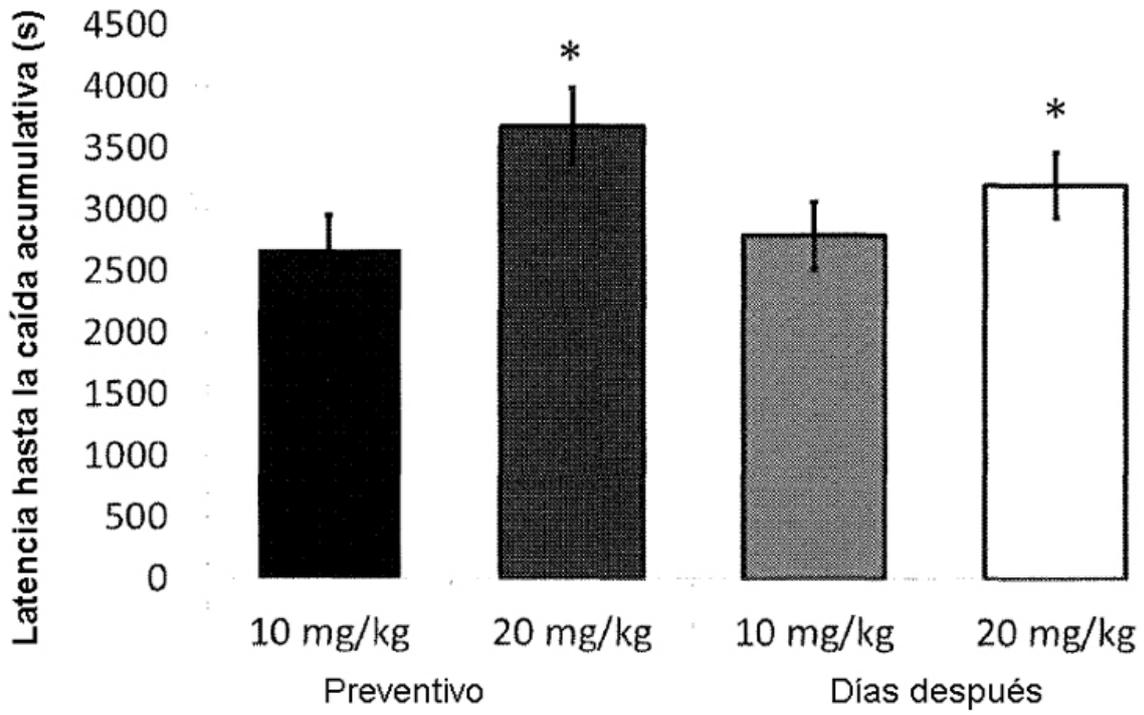


FIG. 20

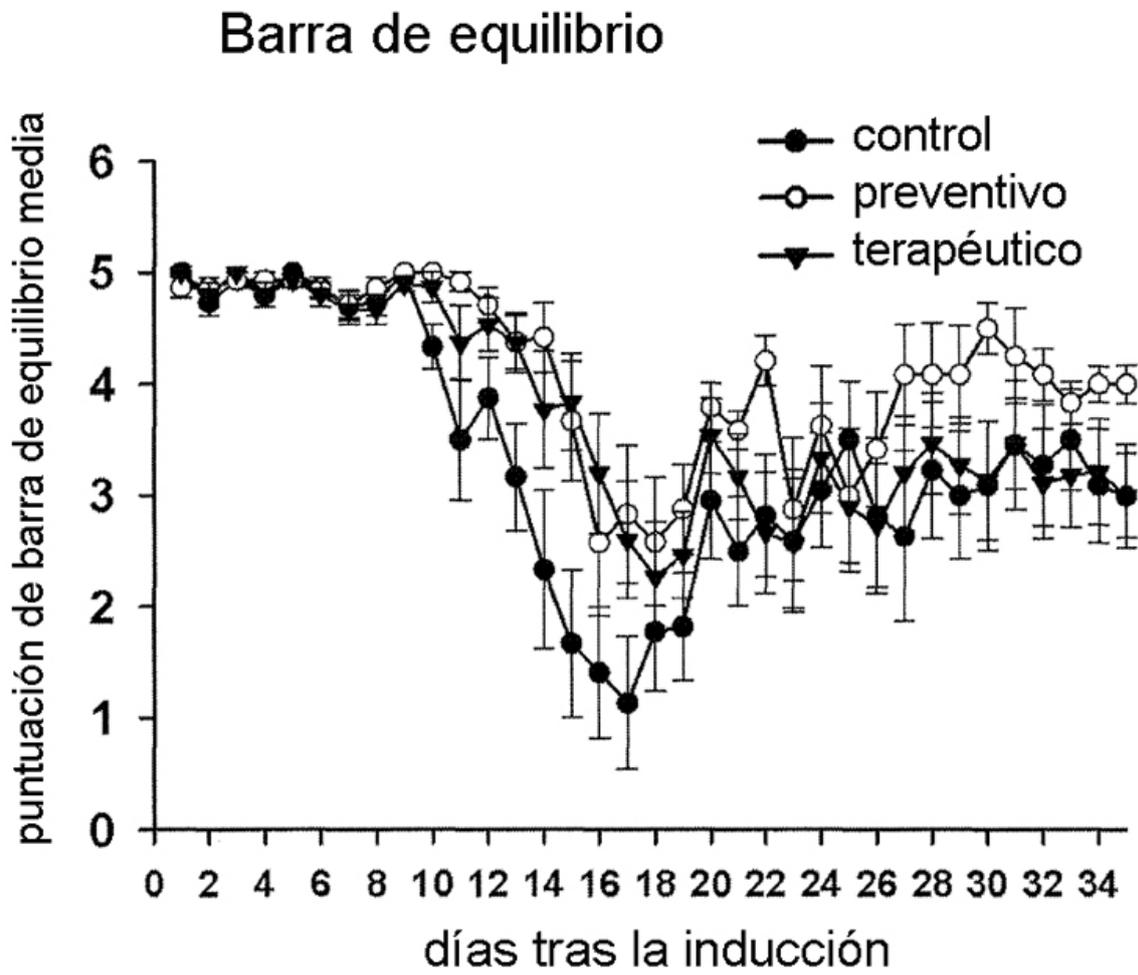


FIG. 21

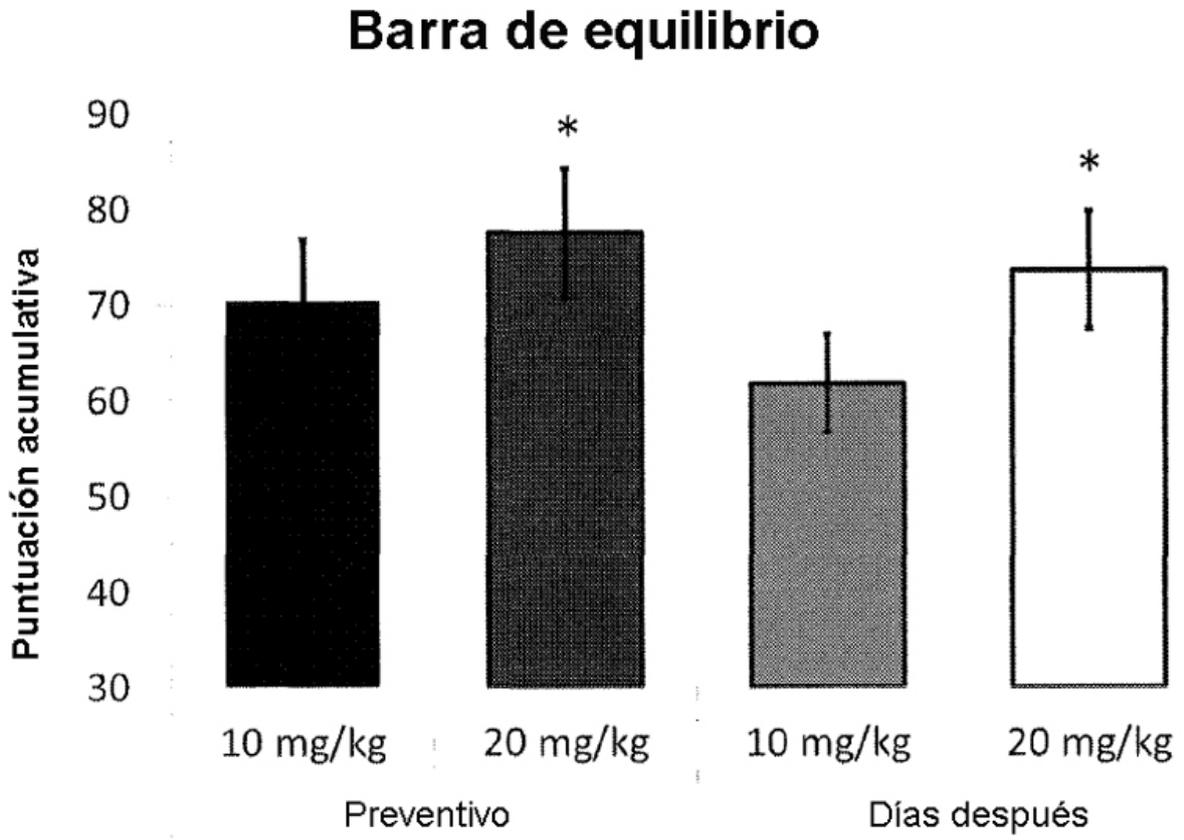


FIG. 22

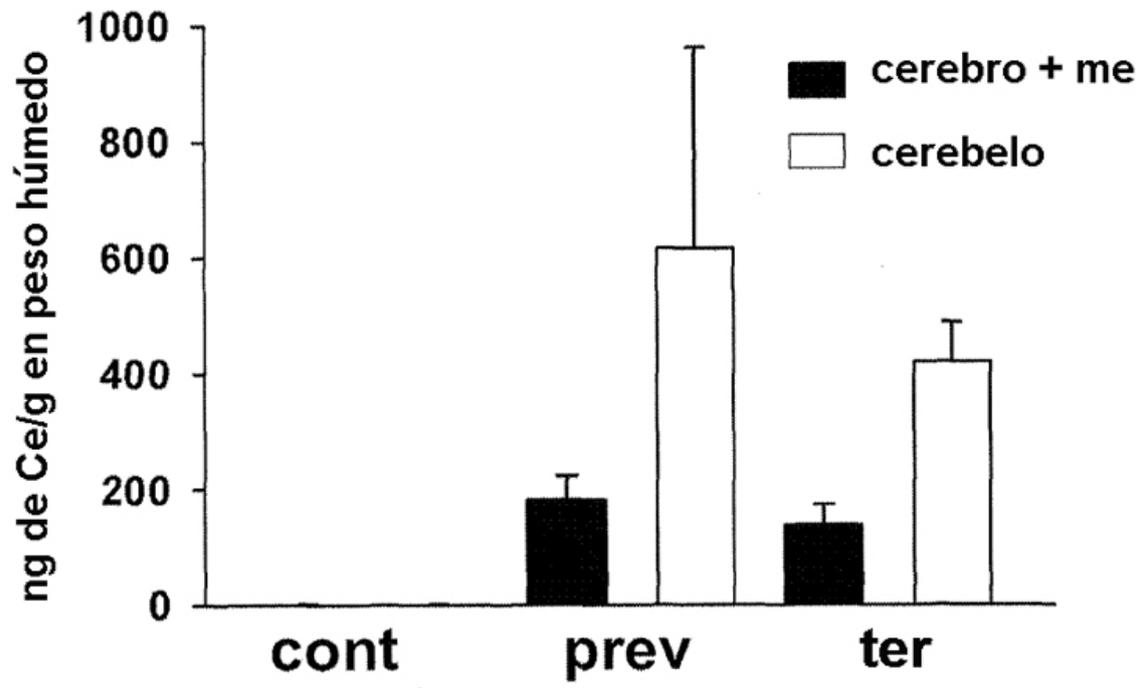


FIG. 23

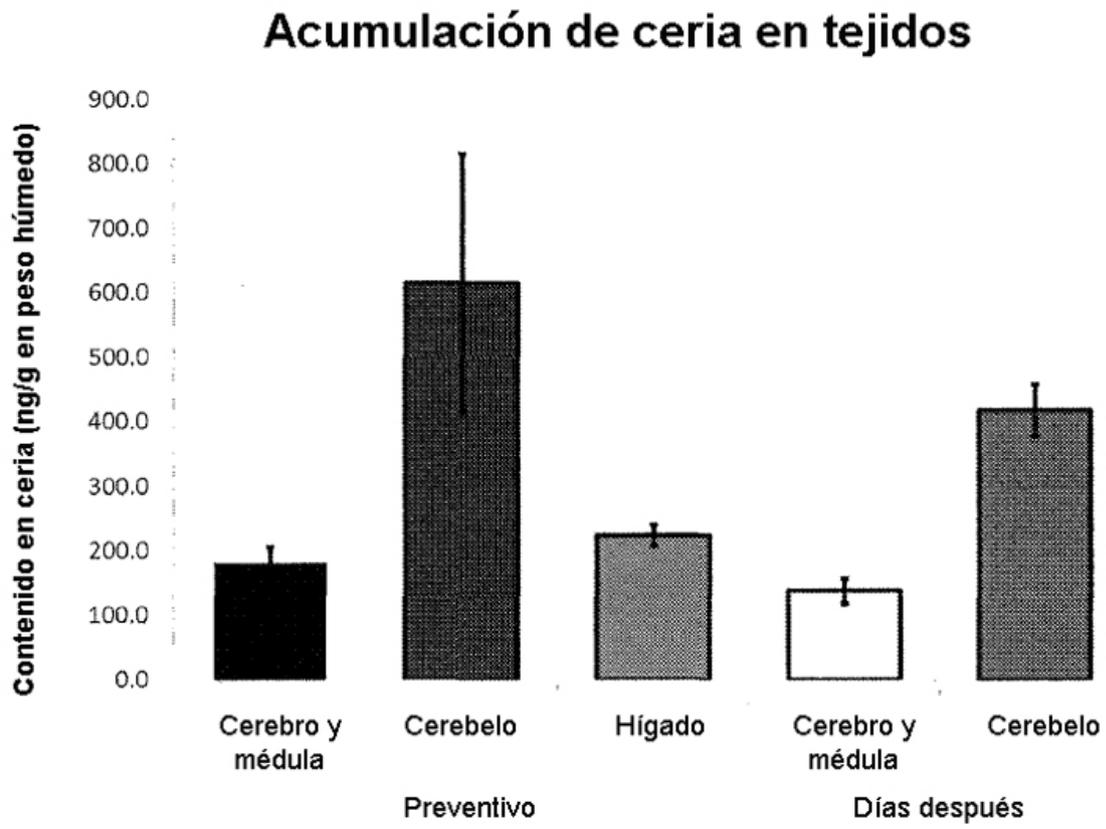


FIG. 24

**Nivel de especies reactivas del oxígeno en el cerebro durante la fase crónica de la enfermedad**

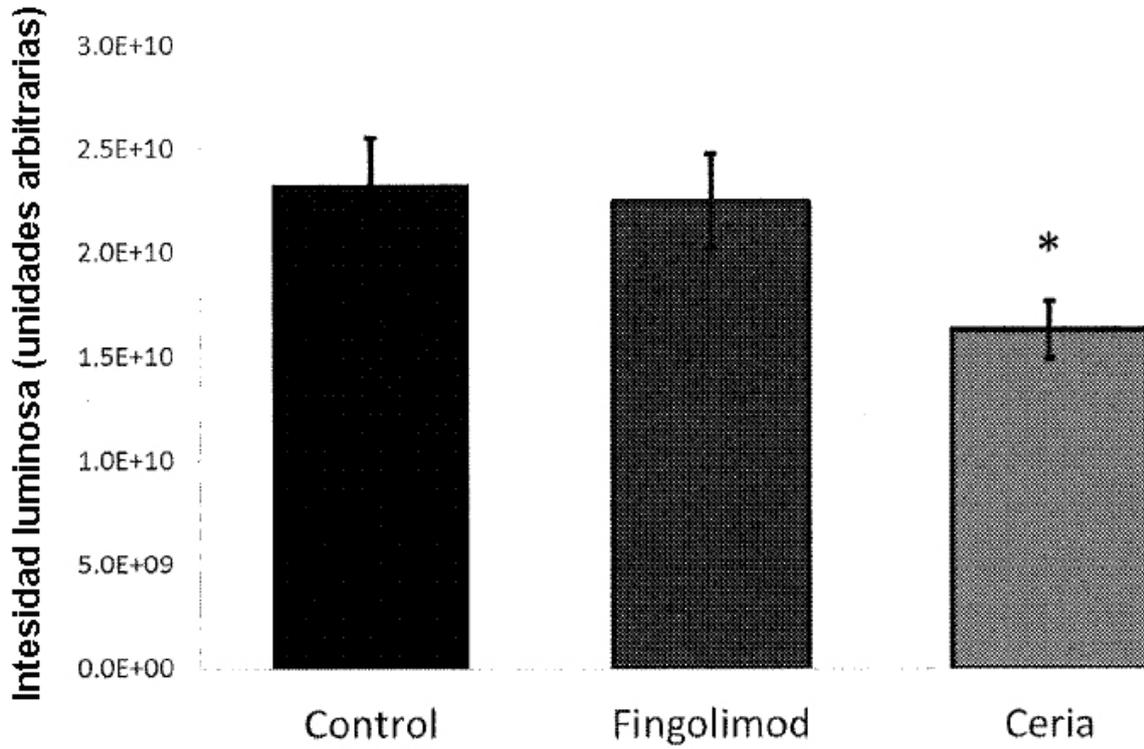


FIG. 25

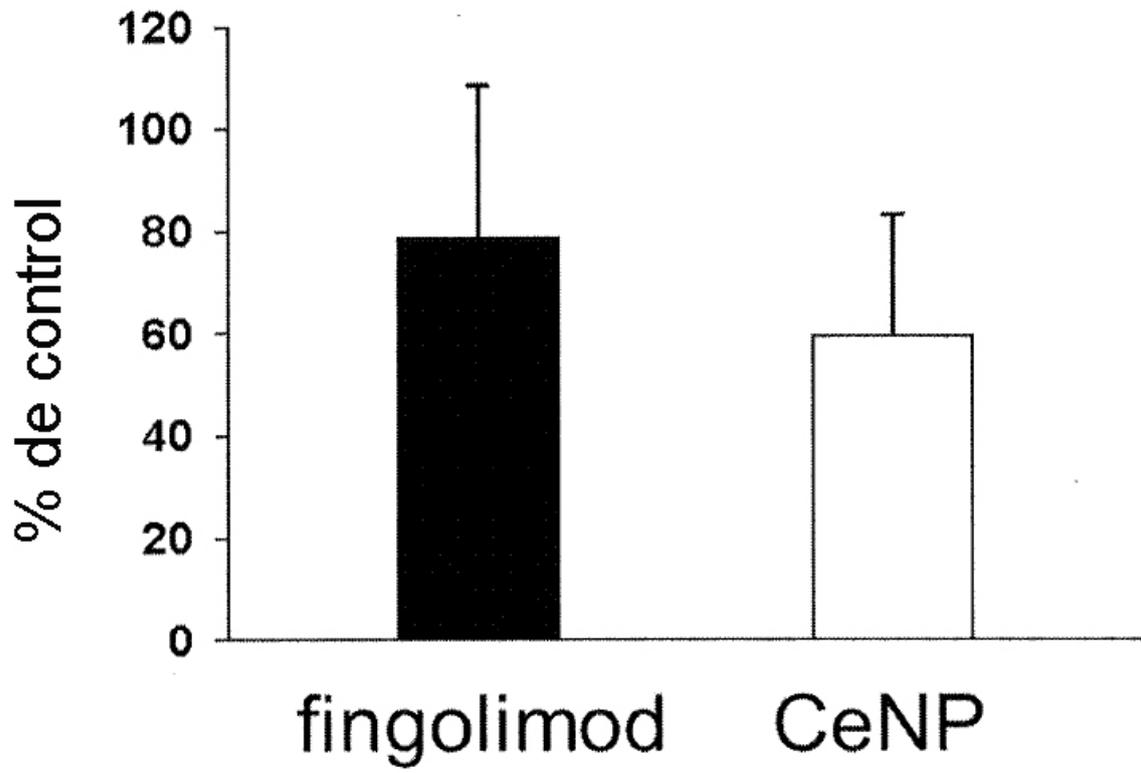


FIG. 26

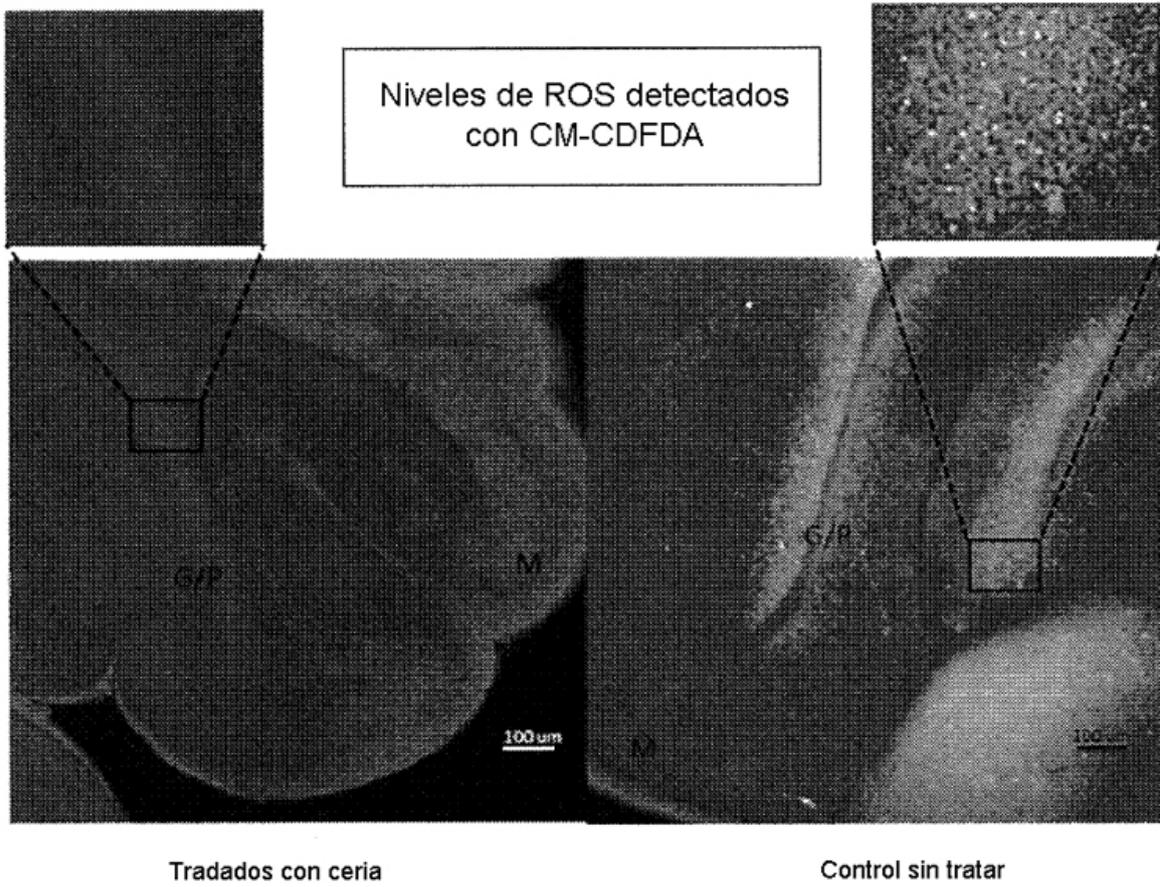
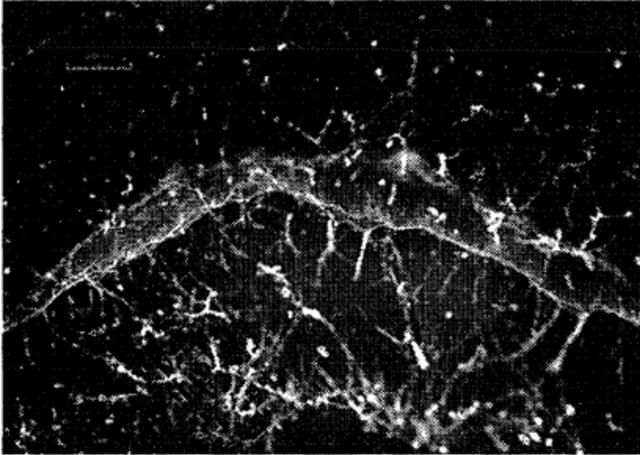


FIG. 27

Tinción capilar del cerebelo en tejido vivo

Anti-laminina



Lóbulo cerebelar 3

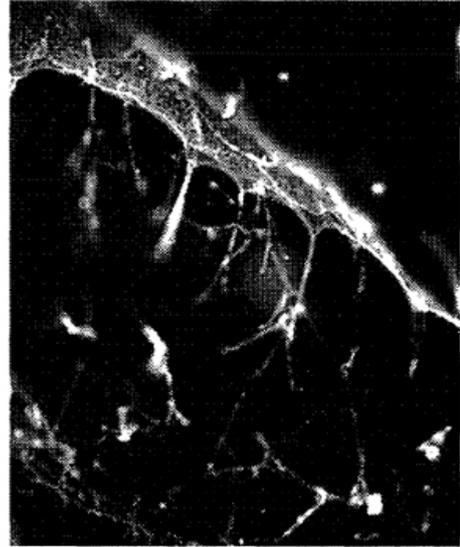


FIG. 28

Puntuaciones clínicas

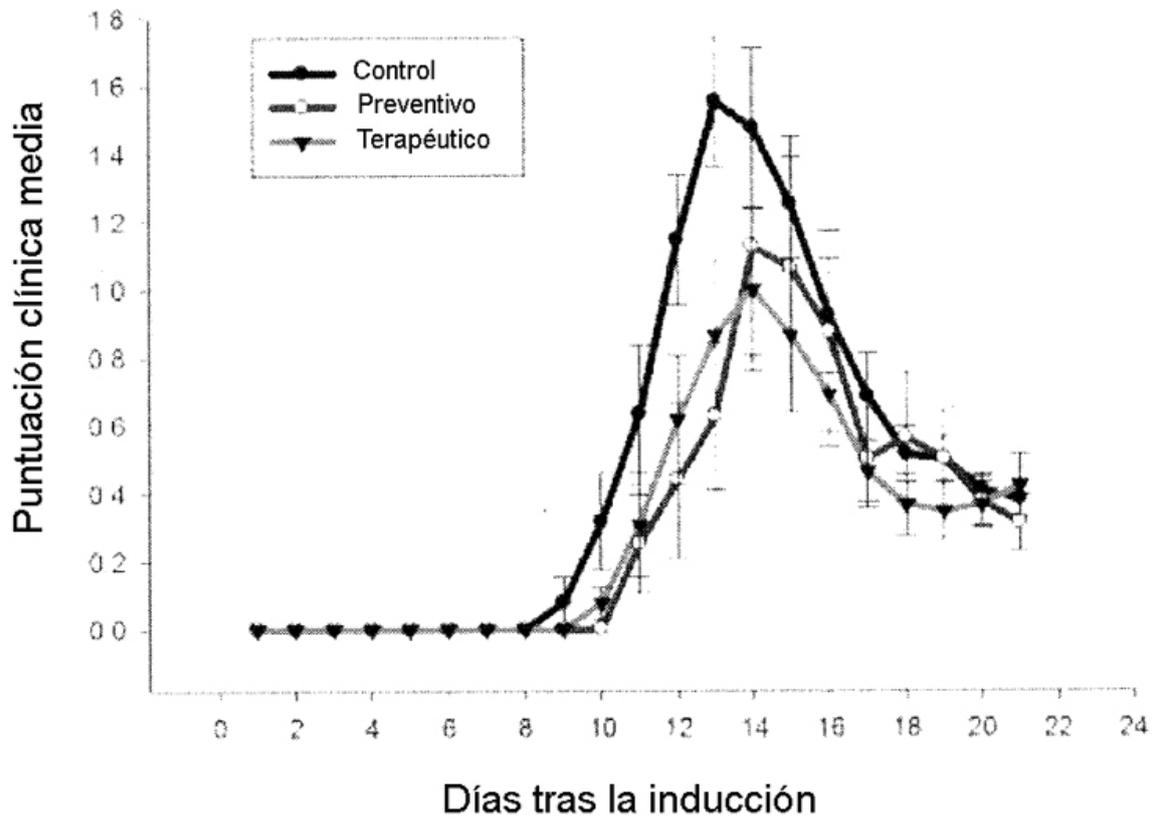


FIG. 29

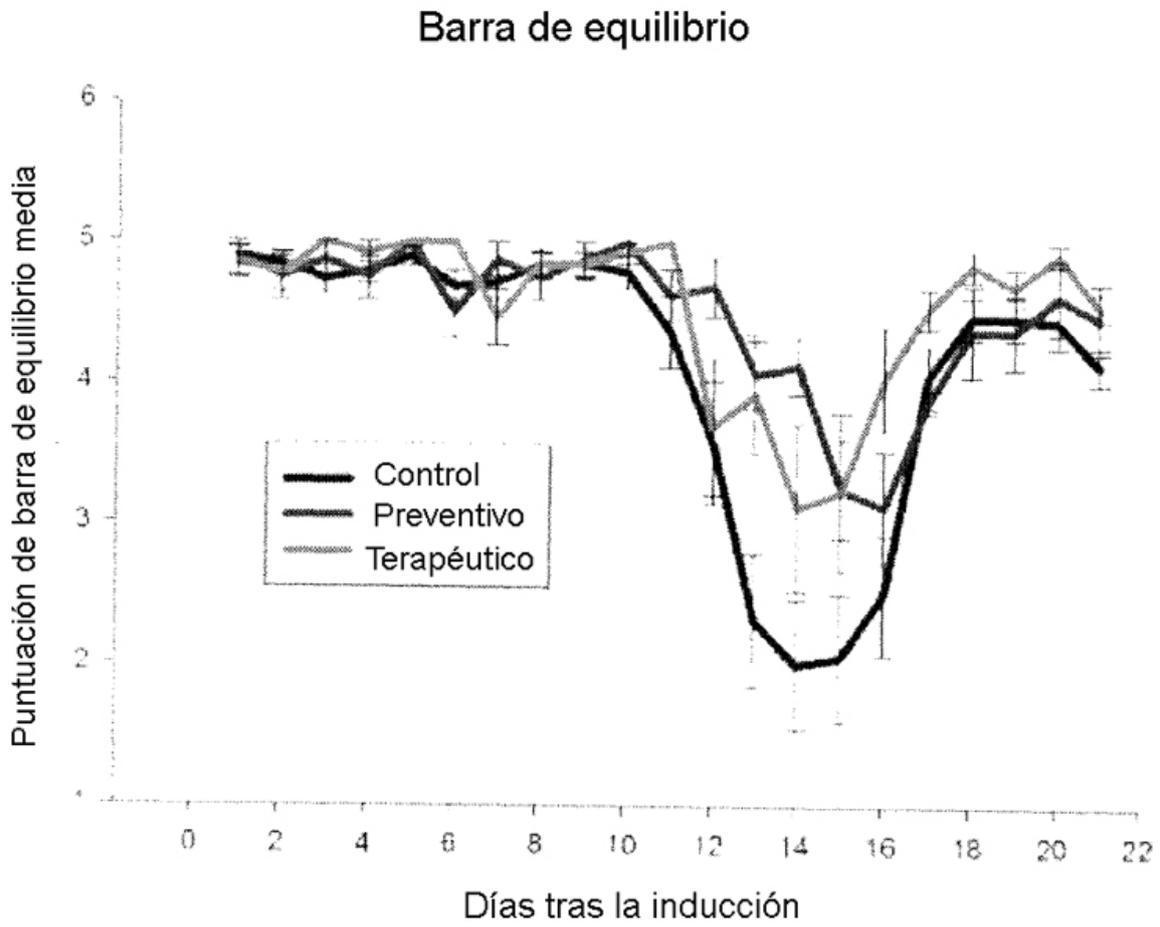


FIG. 30

Varilla colgante

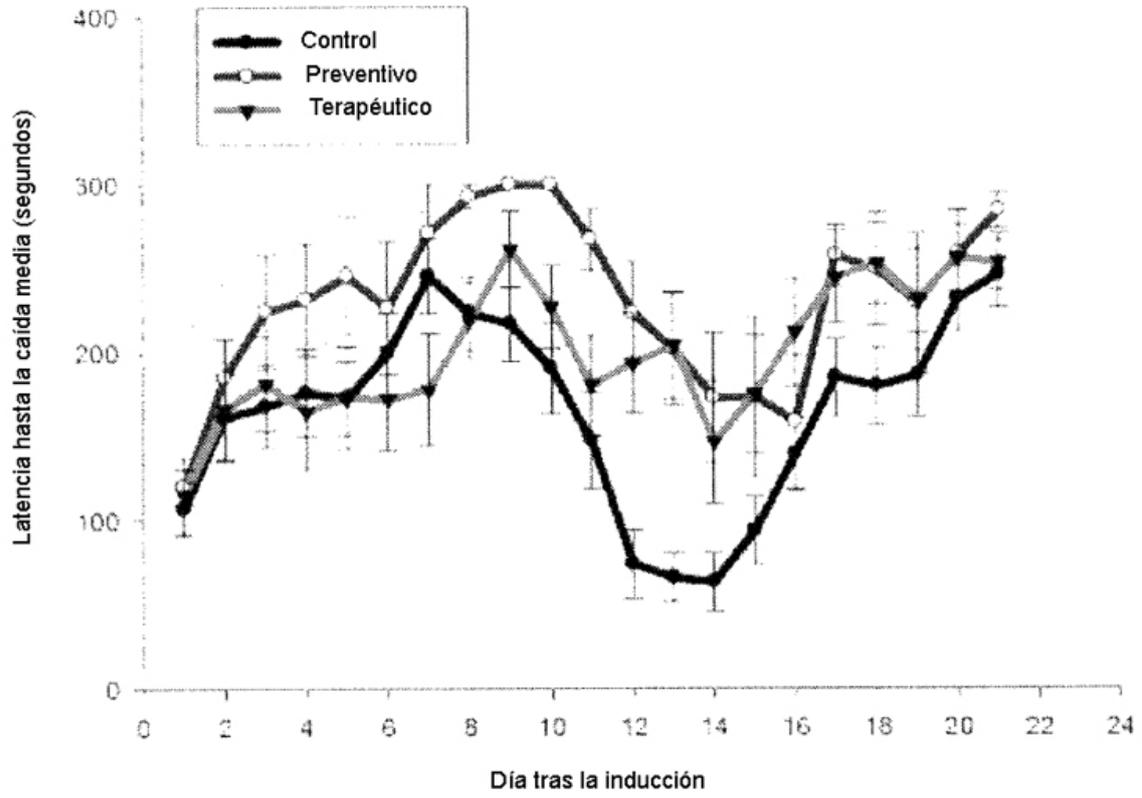


FIG. 31

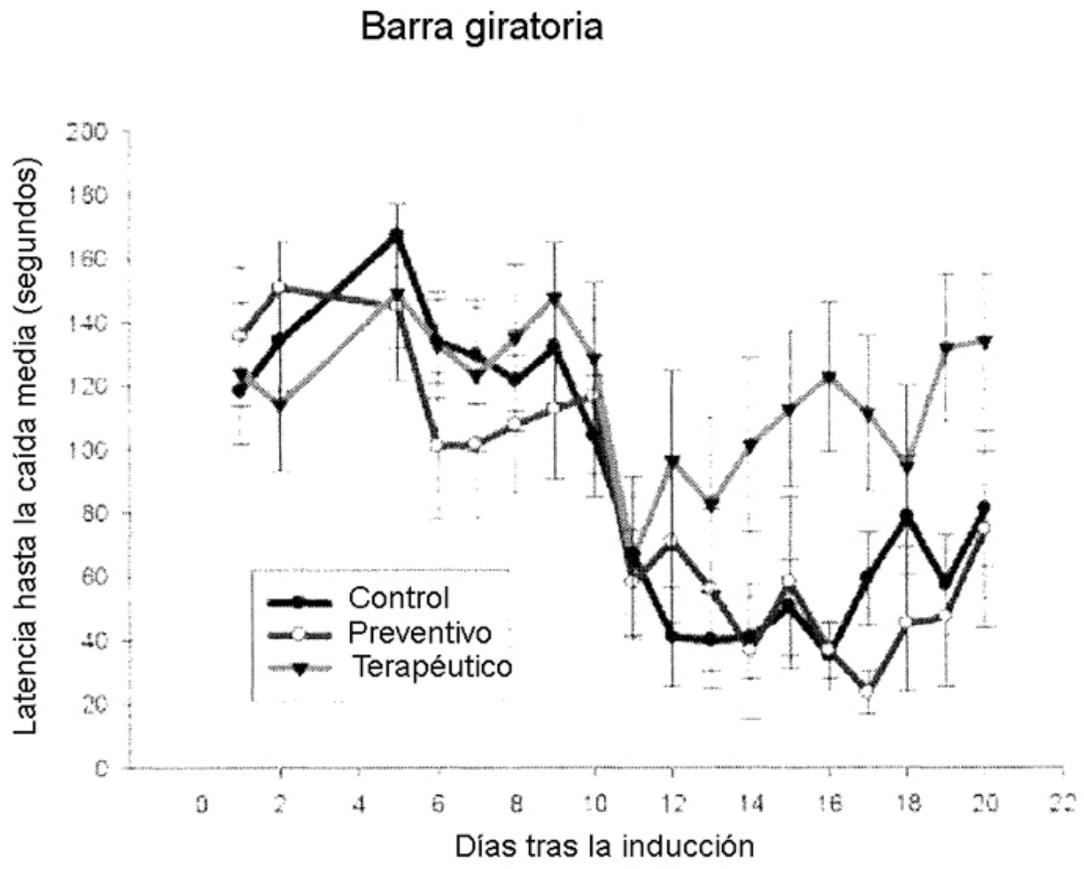
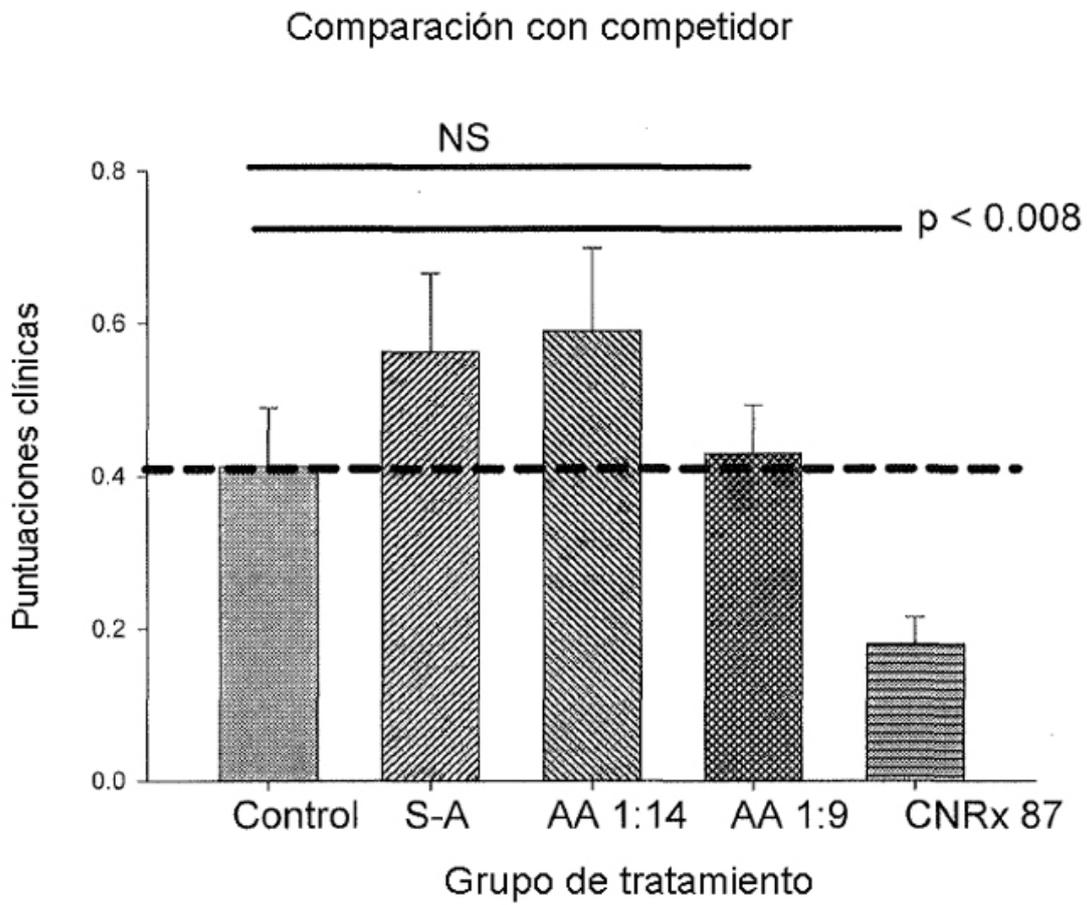


FIG. 32



S-A = Sigma-Aldrich

AA 1:14 = Alfa Aesar Citrato de Ce, razón 1:14

AA 1:9 = Alfa Aesar Citrato de Ce, razón 1:9

FIG. 33

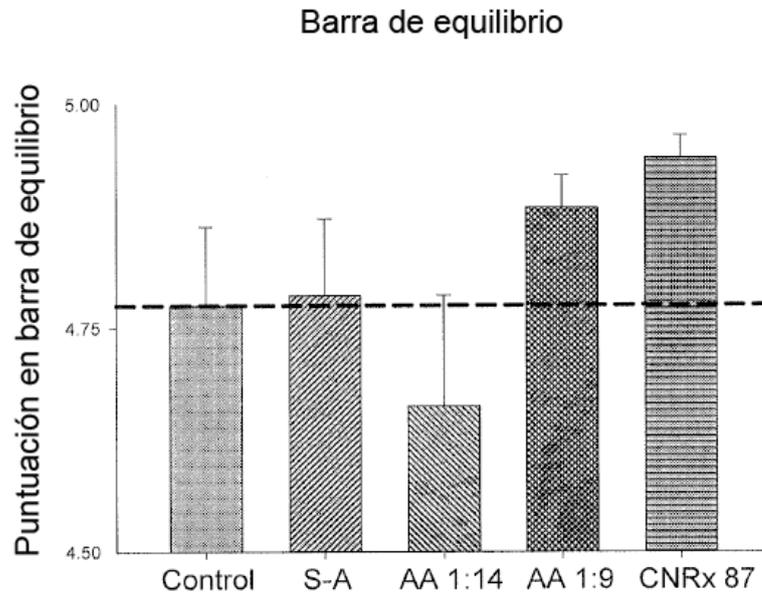


FIG. 34

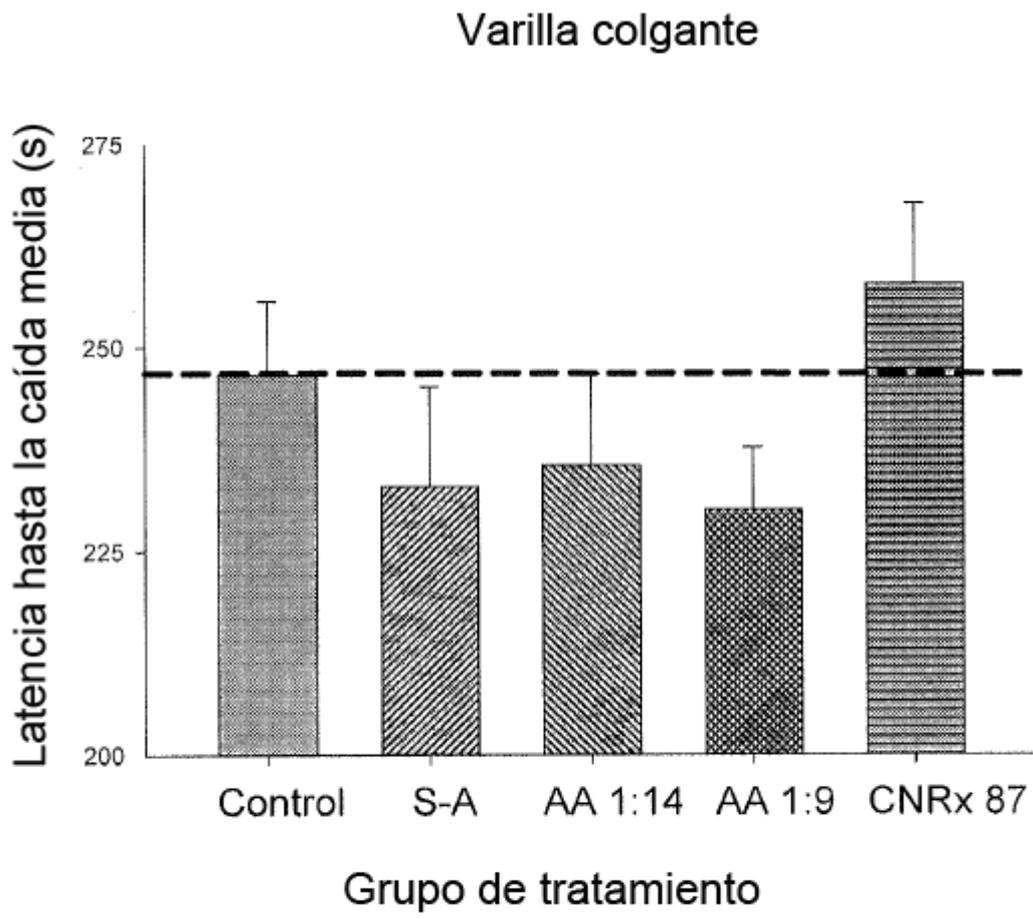


FIG. 35

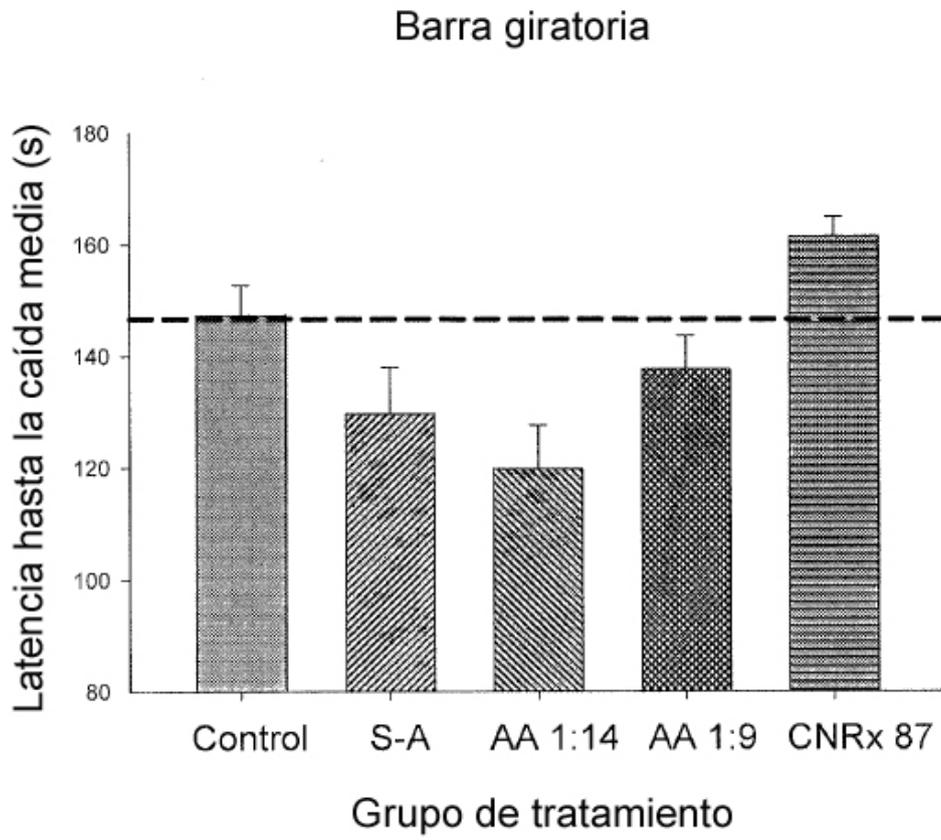


FIG. 36

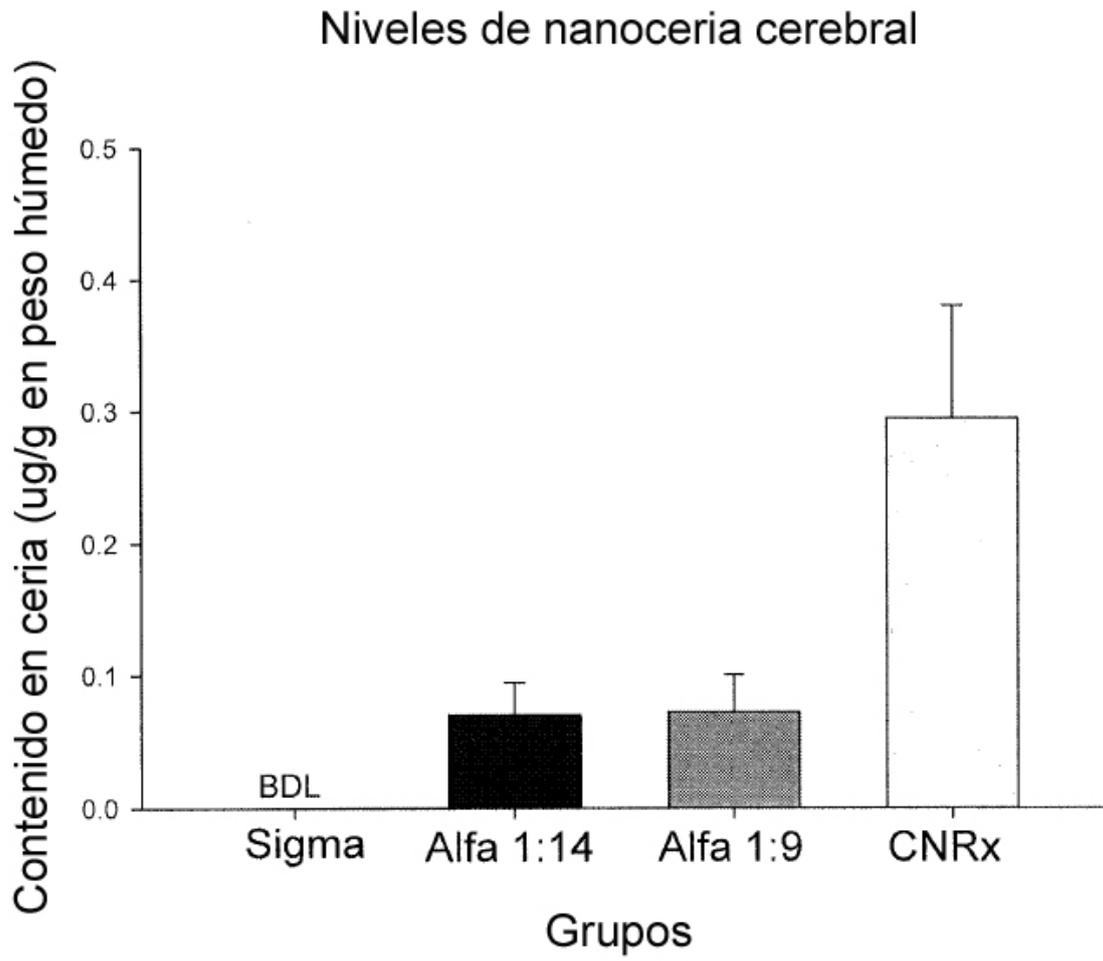


FIG.37

### Contenido de CNRx en el cerebro a lo largo del tiempo

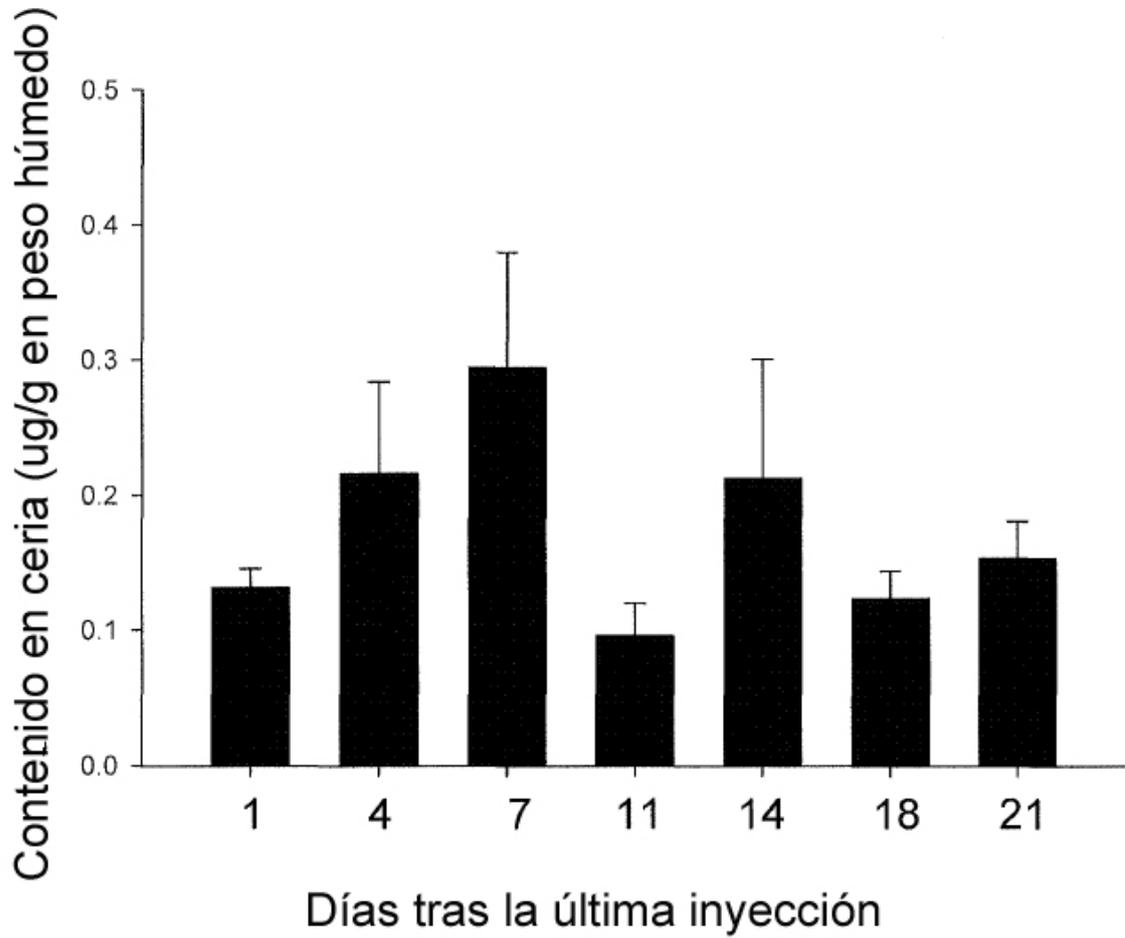


FIG. 38

Eliminación del plasma

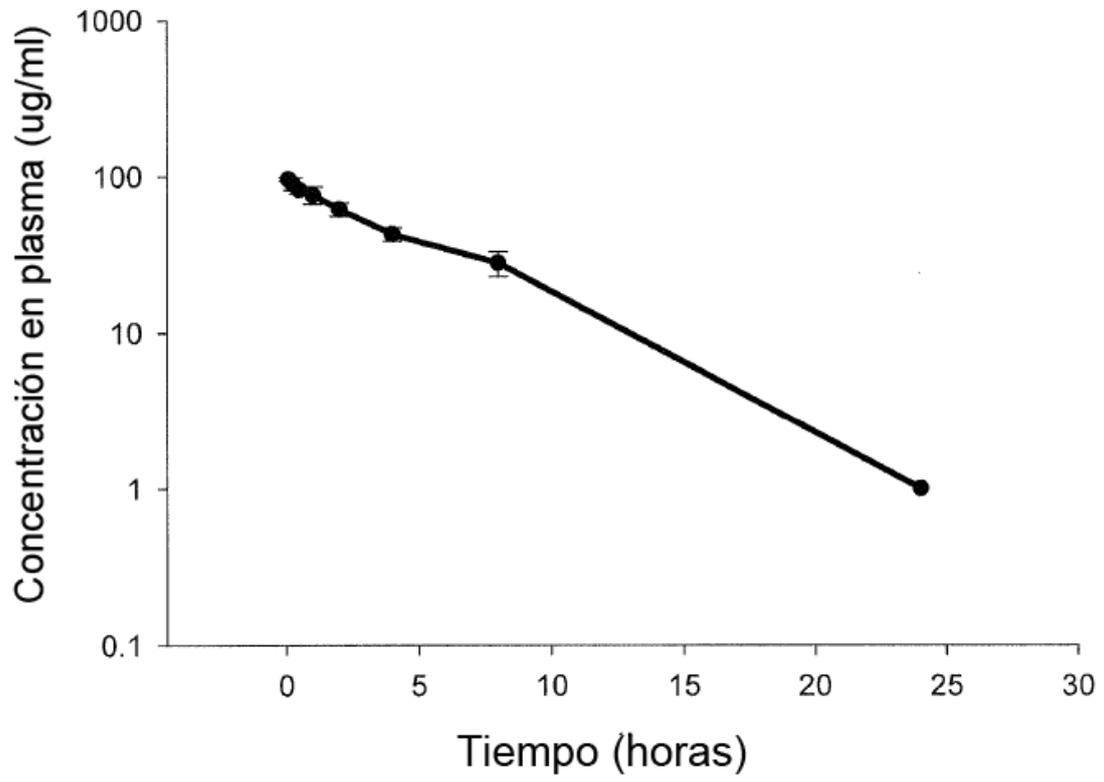


FIG. 39

## CNRx 87 aumenta la vida en ELA

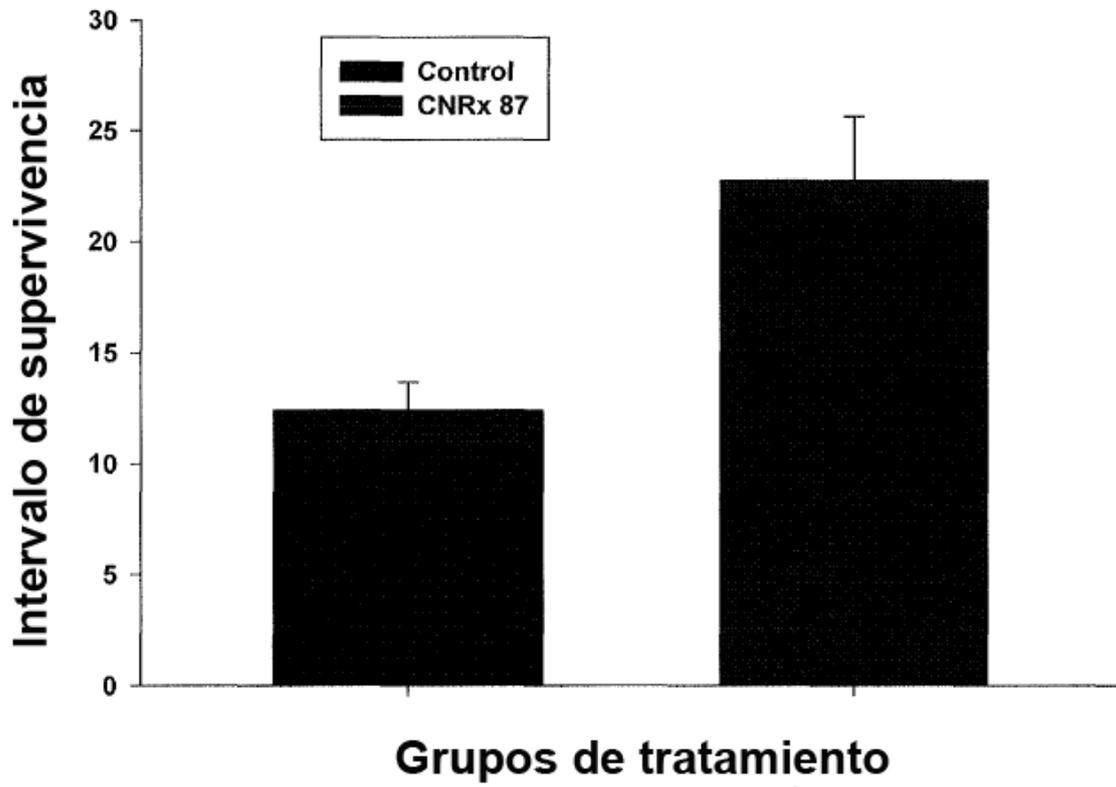


FIG. 40

CNRx 87 disminuye la muerte de tejido en el corazón

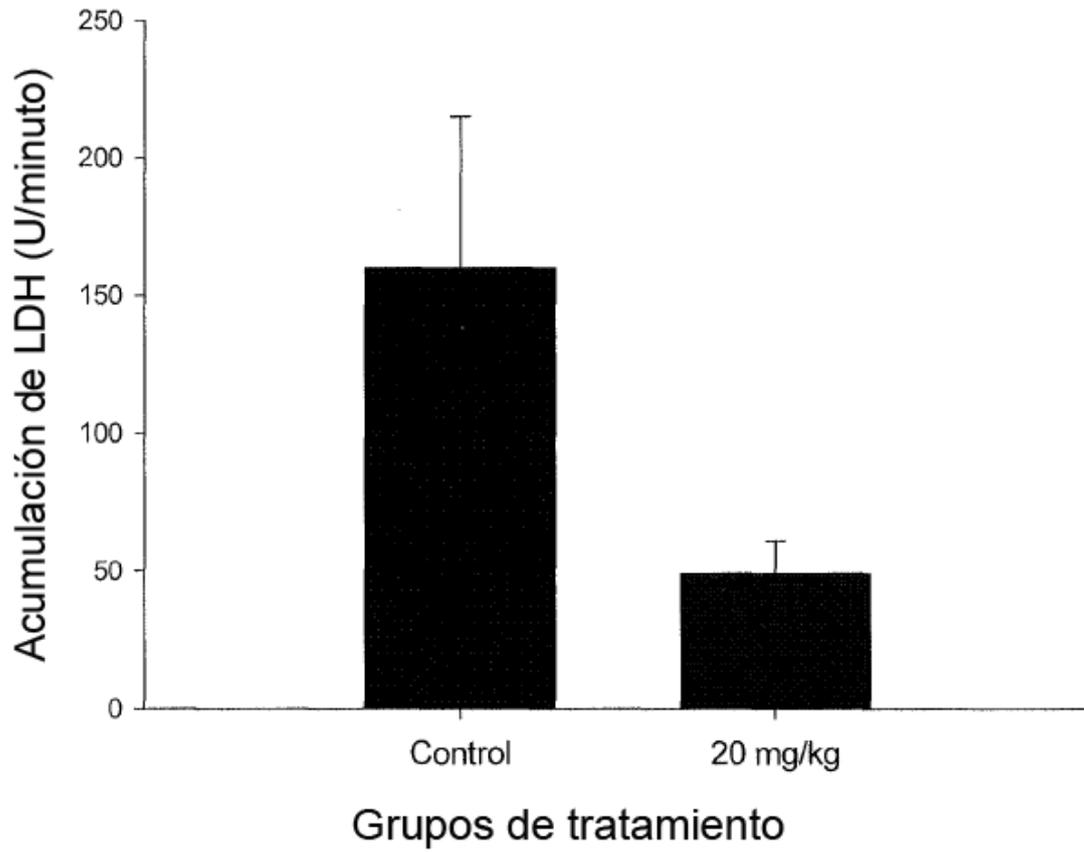


FIG. 41