

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 894**

51 Int. Cl.:

A61K 49/18 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2012** **PCT/US2012/032100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12145169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2012** **E 12773933 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2699157**

54 Título: **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas y su uso en la formación de imágenes de depósitos amiloideos y ovillos neurofibrilares**

30 Prioridad:

21.04.2011 US 201161477958 P

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

14.05.2018

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

AKHTARI, MASSOUD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 667 894 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas y su uso en la formación de imágenes de depósitos amiloideos y ovillos neurofibrilares

Antecedentes

Las nanopartículas son partículas muy pequeñas que varían normalmente en un tamaño tan pequeño como un nanómetro hasta tan grande como varios cientos de nanómetros de diámetro. Su pequeño tamaño permite que las nanopartículas se aprovechen para producir varios productos tales como tintes y pigmentos; revestimientos estéticos o funcionales; herramientas para hallazgos biológicos, formación de imágenes médicas y terapéutica; medio de grabación magnética; puntos cuánticos; e incluso semiconductores uniformes y de tamaño nanométrico.

Los depósitos amiloideos y ovillos neurofibrilares (NFT, también conocidos como filamentos helicoidales acoplados (PHF) son sellos distintivos de diversas enfermedades, entre las que se incluye la enfermedad de Alzheimer (AD). Existe una necesidad en la técnica de métodos de formación de imágenes de depósitos amiloideos y NFT en los cerebros de individuales vivos que tienen o que se sospecha que tienen AD.

Bibliografía

Patentes de Estados Unidos con números 6.548.264 y 6.767.635; Berry and Curtis (2003) J. Phys. D: Applied Physics 36:R198-R206; Pankhurst y col. (2003) J. Phys. D: Applied Physics 36:R167-R181; Dousset y col. (1999) Am. J. Neuroradiol. 20:223-227; Dunning y col. (2004) J. Neurosci. 24:9799-9810; Dousset y col. (1999) Magnetic Resonance in Medicine 41:329-333; Moghimi et al. (2001) Pharmacol. Rev. 53: 283-318; Puchter y col. (1962) J. Histochem. Cytochem. 10:35; Klunk y col. (2004) Annals Neurol. 55/306; patente de Estados Unidos n.º 7.270.800; Agdeppa y col. (2003) Neurosci. 117/723; patente de Estados Unidos n.º 5.411.730; patente de Estados Unidos n.º 6.534.039; WO 2006/102377; Lee y col. (2003) J. Neuroimaging 13:199. La Patente de los Estados Unidos n.º 6.274.119 describe un método para etiquetar placas β -amiloideas y ovillos neurofibrilares *in vivo* e *in vitro* usando derivados de naftaleno. La publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0206146 proporciona nanopartículas magnéticas funcionalizadas que muestran unión diferencial a un tejido, involucrando tejido cerebral, que comprende un grupo funcional.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nanopartículas magnéticas nanofuncionalizadas (MNP) que comprenden un grupo funcional que se une a depósitos amiloideos y/o NFT (PHF) en el que el grupo funcional es 2-(1-{6-[(2-hidroxietyl)(metil)amino]-2-naftil}etilideno)malononitrilo (HODDNP). La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden las MNP funcionalizadas y métodos de uso de las MNP funcionalizadas en la formación de imágenes de depósitos β -amiloideos y/o NFT (PHF).

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B representan imágenes de resonancia magnética (MR) de un cerebro de rata no tratado previamente.

Las figuras 2A y 2B representan imágenes de MR del cerebro de un modelo de rata de enfermedad de Alzheimer.

Las figuras 3A y 3B representan imágenes de MR del cerebro de una segunda rata que es un modelo de rata de enfermedad de Alzheimer.

La figura 4A-C represente imágenes de MR representativas del cerebro de un modelo de rata de AD.

Las figuras 5A-D representan la presencia de placas difusas en el cerebro de un modelo de rata de AD, usando MRI. Al modelo de rata de AD se le administró DNP-MNP.

Las figuras 6A y 6B representan cepa de Perl aumentada por DAB de un modelo de rata de AD transgénico.

La figura 7 representa un método de conjugación de 2-(1-{6-[(2-hidroxietyl)(metil)amino]-2-naftil}etilideno)malononitrilo (HODDNP) a una nanopartícula magnética.

La figura 8 representa un método de conjugación de (4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (PIB-2) a una nanopartícula magnética.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene un diámetro de entre aproximadamente 1 y 1.000 nm. De manera similar, por la expresión "nanopartículas" se refiere a una pluralidad de partículas que tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 1 y 1.000 nm.

La referencia al "tamaño" de una nanopartícula es una referencia a la longitud de la dimensión recta más larga de la nanopartícula. Por ejemplo, el tamaño de una nanopartícula perfectamente esférica es su diámetro.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "grupo funcional", que se usa indistintamente con "resto

funcional" y "ligando funcional", se refiere a un grupo químico que imparte una función particular a un artículo (por ejemplo, nanopartícula) que soporta el grupo químico. Por ejemplo, los grupos funcionales pueden incluir sustancias tales como anticuerpos, oligonucleótidos, biotina o estreptavidina que son conocidas por unir moléculas particulares; o pequeños grupos químicos tales como aminas, carboxilatos y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" o "individuo" o "paciente" se refiere a cualquier sujeto para quien o cuyo diagnóstico, pronosis o terapia se desea y generalmente se refiere al receptor de un método diagnóstico, un método pronóstico o un método terapéutico, a practicar de acuerdo con la presente divulgación. El sujeto puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ganado doméstico, un sujeto de laboratorio (por ejemplo, un modelo de animal no humano para una enfermedad asociada con depósitos β -amiloideos y/o NFT; por ejemplo, un roedor tal como una rata) o una mascota animal.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratando", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en lo referente a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en lo referente a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la enfermedad o un síntoma de una enfermedad de que aparezca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado por tenerla (por ejemplo, incluyendo enfermedades que pueden asociarse con o estar causadas por una enfermedad primaria; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La materia objeto que no está abarcada por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención presentemente reivindicada.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor declarado o intermedio en el intervalo indicado, está comprendido dentro de la invención. Pueden incluirse independientemente los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños y también se encuentran incluidos en la presente invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyan uno cualquiera o ambos de los límites incluidos.

Salvo que definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o la prueba de la presente invención cualquier método y materiales similares a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, cuando se hace referencia a "una nanopartícula magnética funcionalizada" incluye una pluralidad de tales nanopartículas magnéticas funcionalizadas. Cabe destacar además que las reivindicaciones pueden redactarse de tal modo que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esta afirmación pretende servir como fundamento para el uso de dicha terminología excluyente tal como "solamente", "solo" y similares en relación con la cita de los elementos de las reivindicaciones o para el uso de una limitación "negativa".

Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento constituya una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteponer dicha publicación por virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes a las fechas de publicación reales, lo que podría necesitar ser confirmado de manera independiente.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona nanopartículas magnéticas funcionalizadas (MNP) que son adecuadas para su uso en la formación de imágenes de tejido cerebral en un individuo vivo que tiene o se sospecha que tiene depósitos β -amiloideos y/o NFT. Una MNP funcionalizada distingue entre tejido neurológico con depósitos amiloideos y/o ovillos neurofibrilares (NFT, también conocidos como filamentos helicoidales acoplados, PHF) y tejido neurológico normal. Una MNP funcionalizada puede usarse para detectar y cuantificar depósitos amiloideos y/o NFT en enfermedades entre las que se incluye, por ejemplo, síndrome de Down o enfermedad de Alzheimer (AD).

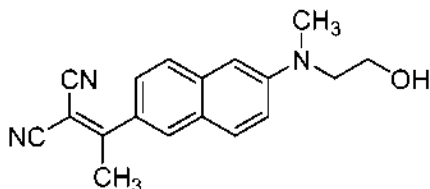
Una MNP funcionalizada puede usarse para detectar y cuantificar depósitos amiloideos y/o NFT en el cerebro de un mamífero vivo, por ejemplo, un ser humano, un animal no humano o un modelo de animal no humano de una

enfermedad asociada con o resultante de depósitos β -amiloideos y/o presencia de NFT. Una composición farmacéutica que comprende una MNP funcionalizada se administra a un mamífero vivo. Cualquier depósito β -amiloideo (por ejemplo, β -amiloideo agregado tal como puede asociarse con ovillos neurofibrilares) presente en el cerebro puede visualizarse usando formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o cualquier otro método de formación de imágenes apropiado.

Restos funcionales

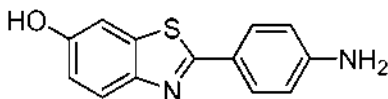
Los grupos funcionales (restos) que pueden unirse a una partícula magnética incluyen grupos funcionales que posibilitan la unión a los agregados de péptidos β -amiloideos y/o NFT. El grupo funcional de la presente invención que posibilita la unión a agregados de péptidos β -amiloideos y/o NFT y que se une a una nanopartícula magnética en la composición de la invención es 2-(1-{6-[(2-hidroxietyl)(metil)amino]-2-naftil}etilideno)malononitrilo (HODDNP). Otros grupos funcionales descritos en el presente documento que posibilitan la unión a agregados de péptidos β -amiloideos y que pueden unirse a una nanopartícula magnética incluyen (4'-aminofenil)-6-hidroxibenzotiazol (PIB-2) y análogos y derivados del mismo.

El HODDNP puede conjugarse a una MNP mediante una cantidad de sitios de unión en la molécula de HODDNP. HODDNP tiene la siguiente fórmula:



Por ejemplo, HODDNP puede conjugarse a una MNP a través del resto de hidroxilo de HODDNP. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a HODDNP mediante unión covalente de HODDNP a una MNP epoxi a través del resto de hidroxilo de HODDNP mediante un enlazador apropiado. HODDNP pueden unirse covalente o no covalentemente a una MNP directamente o mediante un enlazador apropiado a través de cualquiera de los restos de nitrógeno o carbono de la molécula o sus modificaciones, precursores, derivados o variantes.

Como se describe en el presente documento, PIB-2 puede conjugarse a una MNP mediante una cantidad de sitios de unión en la molécula de PIB-2. PIB-2 tiene la siguiente fórmula:

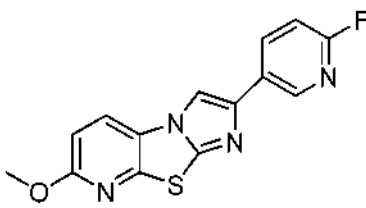


Por ejemplo, PIB-2 puede conjugarse a una MNP a través del nitrógeno de amino de PIB-2. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a PIB-2 mediante unión covalente de PIB-2 a una MNP epoxi a través del nitrógeno de amino de PIB-2 mediante un enlazador apropiado. Asimismo, PIB-2 puede conjugarse a una MNP a través del oxígeno fenólico de PIB-2. Como un ejemplo no limitante, Pueden prepararse MNP conjugadas a PIB-2 mediante unión covalente de PIB-2 a una MNP epoxi a través del oxígeno fenólico de PIB-2 mediante un enlazador apropiado.

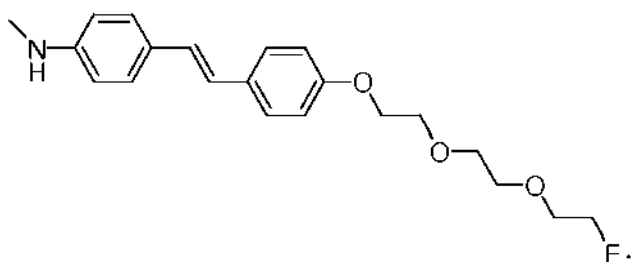
PIB-2 pueden unirse covalente o no covalentemente a una MNP directamente o mediante un enlazador apropiado a través de cualquiera de los restos de nitrógeno, oxígeno, sulfuro o carbono de la molécula o sus modificaciones, precursores, derivados o variantes.

Otros restos funcionales adecuados tal como se describe en el presente documento que pueden acoplarse a una MNP incluyen,

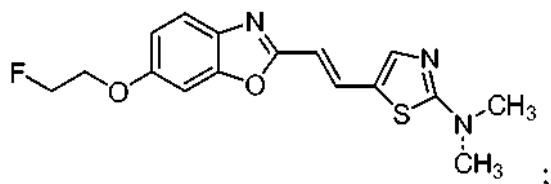
1) W-372 (7-Metoxi-2 (6-fluoropiridin-3-il)imidazo[2,1-b]-8-piridinotiazol)



2) Bay-94-9172 (ZK 6013443;{4-[2-(4-{2-[2-(2-Fluoro-etoxi)-etoxil]-etoxi]-fenil)-vinil]-fenil}-metilamina))

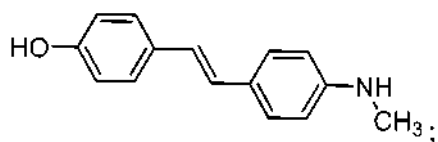


3) BF-227 (2-(2-[2-dimetilaminotiazol-5-il]etenil)-6-(2-[fluoro]etoxi)benzoxazol)



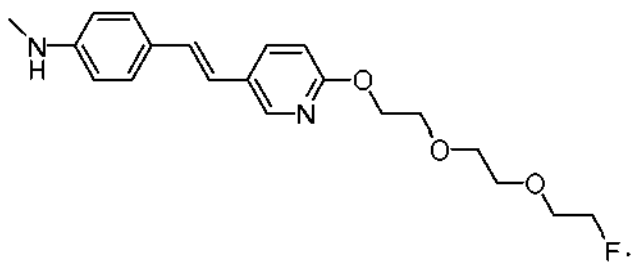
5

4) SB-13 (4-N-metilamino-4'-hidroxiestilbeno)



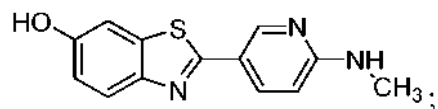
10

5) AV-45 ((E)-4-(2-(6-(2-(2-(2-(fluoroetoxi)etoxi)etoxi)piridin-3-il)vinil)-N-metil benzenamina)



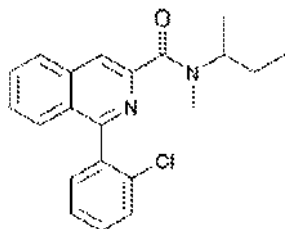
15

6) AZD-2184 (2-[6-(metilamino)piridin-3-il]-1,3-benzotiazol-6-ol)

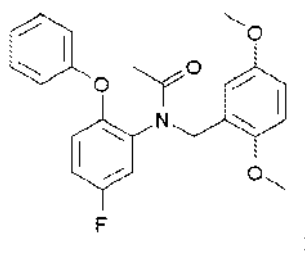


20

7) PK11195 (1-(2-clorfenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolina-carboxamida)

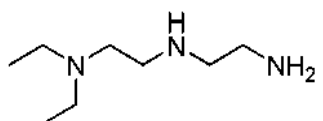


8) DAA1106 (N-(2-fenoxi-5-fluorofenil)-N-(2,5-dimetoxibenzil)acetamida)



y

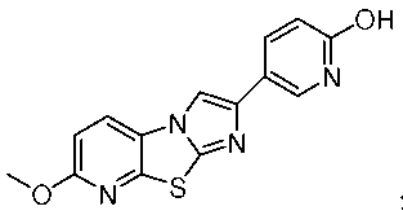
5 9) DED (N,N-dietildietilenotriamina)



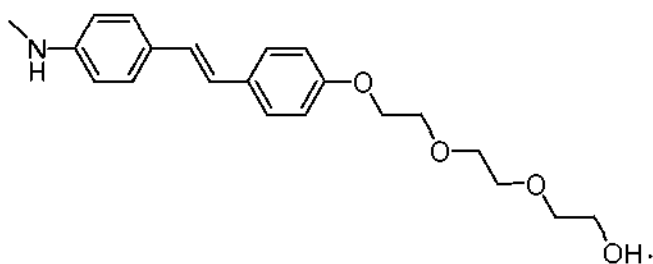
o un derivado o análogo de los mismos.

En cualquiera de los restos funcionales anteriores, puede reemplazarse un grupo de flúor con oxígeno. Por ejemplo, los restos funcionales adecuados pueden conjugarse a una MNP a través del resto de hidroxilo del resto funcional. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a restos funcionales mediante unión covalente de los restos funcionales a una MNP epoxi a través del resto de hidroxilo del resto funcional directamente o mediante un

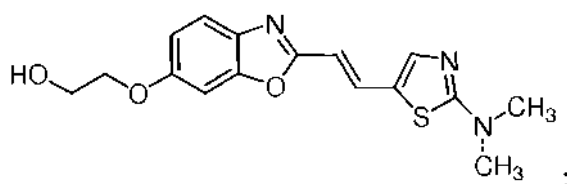
1) W-372-2



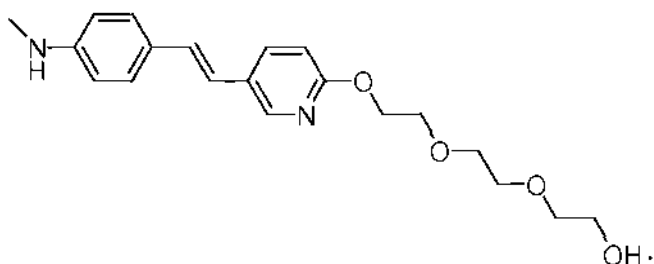
2) Bay-94-9172-2



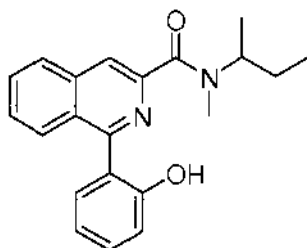
3) BF-227-2



4) AV-45-2

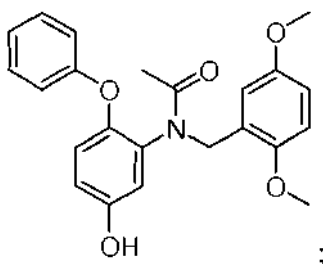


5) PK11195-2



5

y
6) DAA1106-2



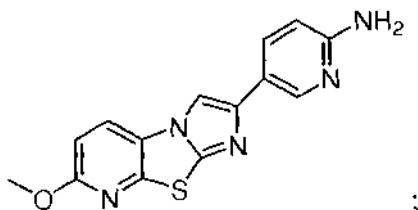
10

o un derivado o análogo de los mismos.

En cualquiera de los restos funcionales anteriores, puede reemplazarse un grupo de flúor con un grupo amino. Por ejemplo, un resto funcional que comprende un grupo amino puede conjugarse, directamente o mediante un enlazador, a una MNP a través del grupo amino del resto funcional. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a restos funcionales mediante unión covalente de los restos funcionales a una MNP epoxi a través del grupo amino del resto funcional mediante un enlazador apropiado. Por ejemplo, otros restos funcionales adecuados que pueden acoplarse a una MNP incluyen,

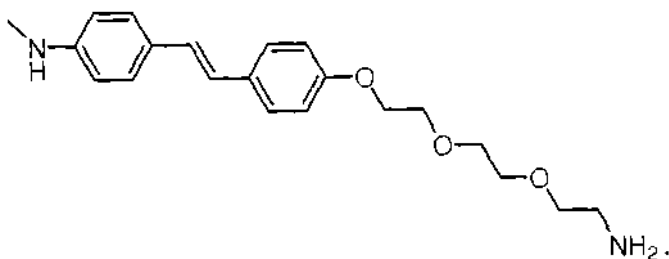
20

1) W-372-3

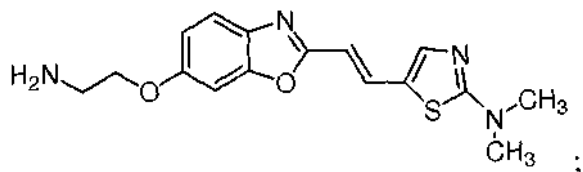


25

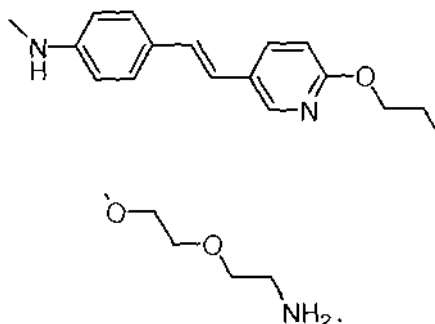
2) Bay-94-9172-3



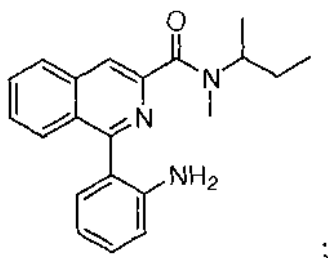
3) BF-227-3



5 4) AV-45-3

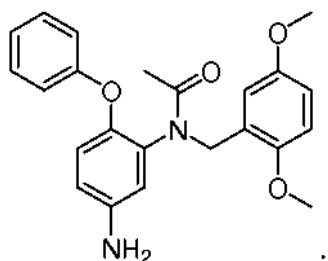


5) PK11195-3



10

y
6) DAA1106-3

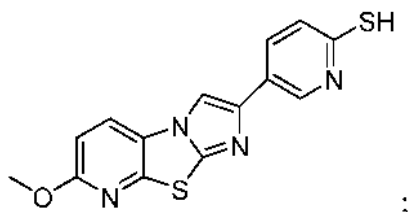


15

o un derivado o análogo de los mismos.

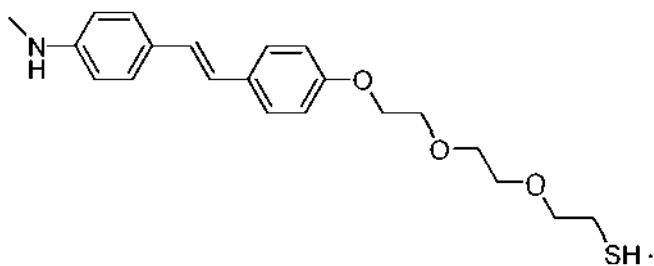
En cualquiera de los restos funcionales anteriores, puede reemplazarse un grupo de flúor con un grupo tiol. Por ejemplo, un resto funcional que comprende un grupo tiol puede conjugarse, directamente o mediante un enlazador, a una MNP a través del grupo tiol del resto funcional. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a restos funcionales mediante unión covalente de los restos funcionales a una MNP epoxi a través del grupo tiol del resto funcional mediante un enlazador apropiado. Por ejemplo, otros restos funcionales adecuados que pueden acoplarse a una MNP incluyen,

1) W-372-4

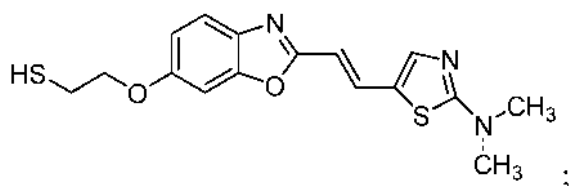


;

5 2) Bay-94-9172-4

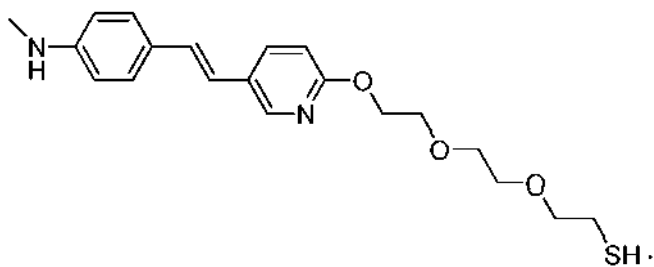


3) BF-227-4

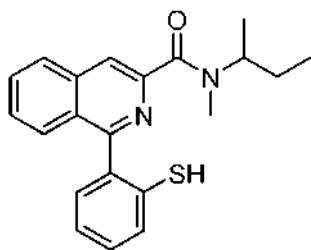


;

4) AV-45-4

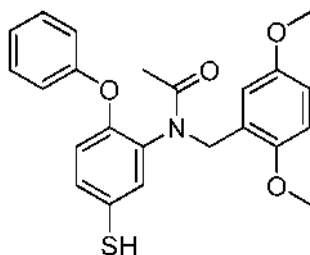


5) PK11195-4



;

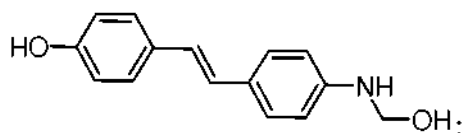
y
6) DAA1106-4



o un derivado o análogo de los mismos.

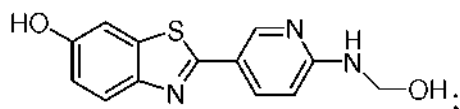
- 5 En cualquiera de los restos funcionales anteriores, puede reemplazarse un grupo alquilo con hidroxialquilo. Por ejemplo, los restos funcionales adecuados pueden conjugarse, directamente o mediante un enlazador, a una MNP a través del resto de hidroxilo del resto funcional adecuado. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a restos funcionales mediante unión covalente de los restos funcionales a una MNP epoxi a través del resto de hidroxilo del resto funcional mediante un enlazador apropiado. Por ejemplo, otros restos funcionales adecuados que
10 pueden acoplarse a una MNP incluyen,

1) SB-13-5



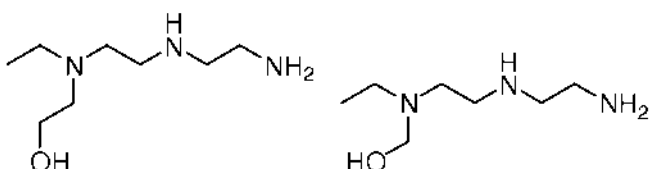
15

2) AZD-2184-5



20

y
3) DED-5



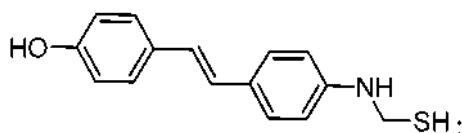
25

o un derivado o análogo de los mismos.

- En cualquiera de los restos funcionales anteriores, puede reemplazarse un grupo alquilo con tioalquilo. Por ejemplo, los restos funcionales adecuados pueden conjugarse a una MNP a través del resto de tiol del resto funcional adecuado. Como ejemplo, Pueden prepararse MNP conjugadas a restos funcionales mediante unión covalente de los restos funcionales a una MNP epoxi a través del resto de tiol del resto funcional mediante un enlazador apropiado. Por ejemplo, otros restos funcionales adecuados que pueden acoplarse a una MNP incluyen,

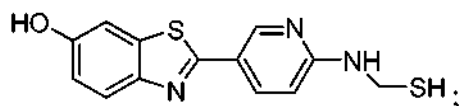
30

1) SB-13-6



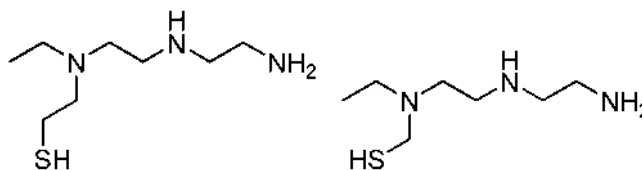
35

2) AZD-2184-6



40

y
3) DED-6



5

o un derivado o análogo de los mismos.

Un resto funcional de una MNP funcionalizada sujeto tiene afinidad por el péptido β -amiloideo (por ejemplo, péptido β -amiloideo agregado) y/o NFT. Por ejemplo, el resto funcional puede tener una afinidad de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, o superior a 10^{-8} M, por el péptido β -amiloideo (por ejemplo, péptido β -amiloideo agregado) y/o NFT.

Una MNP funcionalizada sujeto puede incluir un radiomarcador, por ejemplo, el resto funcional puede incluir un radiomarcador. Como alternativa, una MNP funcionalizada sujeto no incluye un radiomarcador, por ejemplo, el resto funcional no incluye un radiomarcado y ningún otro componente de la MNP funcionalizada comprende un radiomarcador.

Una MNP funcionalizada puede cruzar la barrera hematoencefálica. Una MNP funcionalizada proporciona contraste en los tiempos T2, T2* y T1 de tejidos afectados (por ejemplos, tejidos cerebrales con depósitos β -amiloideos y/o NFT) para hacer que los tejidos sean visibles a la MRI.

Una MNP funcionalizada tiene una semivida relativamente larga (por ejemplo un $t_{1/2}$ de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 14 días; por ejemplo, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 16 horas, de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 días, de aproximadamente 2 días a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 7 días, o de aproximadamente 7 días a aproximadamente 2 semanas).

Nanopartículas magnéticas

30

Las nanopartículas tienen generalmente un tamaño medio que se encuentra en un intervalo de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1.000 nm, por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 750 nm o de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 1000. Los diámetros promedio estarán en algunas realizaciones un intervalo de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1.000 nm, por ejemplo, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 600 nm, de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 800 nm o de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 1000.

Las nanopartículas pueden ser simples agregaciones de moléculas o pueden estar estructuradas en dos o más capas de distintas sustancias. Por ejemplo, las nanopartículas simples que consisten en magnetita o maghemita son adecuadas para su uso. Véase, por ejemplo, Scientific and Clinical Applications of Magnetic Microspheres, U. Hafeli, W. Schutt, J. Teller y M. Zborowski (eds.) Plenum Press, Nueva York, 1997; y Tiefenauer y col., Bioconjugate Chem. 4:347, 1993. Nanopartículas más complejas pueden consistir en un núcleo fabricado de una sustancia y uno o más cortezas fabricadas de otra(s) sustancia(s). La expresión "nanopartícula magnética" incluye nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas diamagnéticas y nanopartículas ferromagnéticas.

Materiales de núcleo ilustrativos de las nanopartículas de la composición de la invención son ferritas de composición general $\text{MeOxFe}_2\text{O}_3$ en las que Me es un metal bivalente tal como Co, Mn o Fe. Otros materiales adecuados son $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, los metales puros Co, Fe, Ni y compuestos de metal tales como carburos y nitruros. El material de núcleo es generalmente un agente visible de MRI. El material de núcleo está normalmente recubierto. Entre los recubrimientos adecuados se incluye, dextrano, albúmina, almidón, silicio y similares.

Muchos tipos distintos de pequeñas partículas (nanopartículas o partículas micrométricas) están disponibles en el mercado a partir de distintos fabricantes entre los que se incluye: Bangs Laboratories (Fishers, Ind.); Promega (Madison, Wis.); Dynal Inc.(Lake Success, Nuva York); Advanced Magnetics Inc.(Surrey, Reino Unido); CPG Inc.(Lincoln Park, N.J.); Cortex Biochem (San Leandro, Calif.); European Institute of Science (Lund, Suecia);

60

Ferrofluidics Corp. (Nashua, N.H.); FeRx Inc.; (San Diego, Calif.); Immunicon Corp.; (Huntingdon Valley, Pa.); Magnetically Delivered Therapeutics Inc. (San Diego, Calif.); Miltenyi Biotec GmbH (EE.UU.); Microcaps GmbH (Rostock, Alemania); PolyMicrospheres Inc. (Indianapolis, Ind.); Scigen Ltd.(Kent, Reino Unido); Seradyn Inc.; (Indianapolis, Ind.); y Spherotech Inc. (Libertyville, Ill.). La mayoría de estas partículas están fabricadas usando técnicas convencionales, tales como trituración y molturación, polimerización de emulsión, copolimerización en bloque y microemulsión.

También se ha informado de métodos de fabricación de nanopartículas de sílice. Los procesos implican la agregación al núcleo de cristalitas (Philipse y col., Langmuir, 10:92, 1994); la fortificación de nanopartículas de polímero superparamagnéticas con sílice intercalado (Gruttner, C y J Teller, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 194:8, 1999); y autoensamblaje mediado por microondas (Correa-Duarte y col., Langmuir, 14:6430, 1998).

Los núcleos de nanopartícula son magnéticos y pueden incluir un metal seleccionado a partir del grupo que consiste en magnetita, maghemita y greigita. Las nanopartículas magnéticas pueden fabricarse usando materiales magnéticos tales como magnetita, maghemita y greigita como parte del núcleo. Mediante la variación del tamaño y forma global de tales núcleos magnéticos, pueden hacerse superparamagnéticas o de único dominio estable (partículas que retienen un momento magnético estable después de ser retiradas de un campo magnético). El tamaño del núcleo se refiere a si una nanopartícula magnética es superparamagnética o de dominio único. Por tanto, las partículas superparamagnéticas relativamente equidimensionales generalmente tienen un núcleo con un tamaño inferior a 50 a 80 nm. En tamaños de partícula por encima de este intervalo superior, la magnetización de la partícula se separa en dominios de vectores de magnetización distintos con el fin de minimizar las energías magnéticas internas.

En algunas realizaciones, el núcleo incluye un pigmento que puede ser una sal inorgánica tal como permanganato de potasio, dicromato de potasio, sulfato de níquel, cloruro de cobalto, cloruro de hierro (III) o nitrato de cobre. De manera similar, el núcleo puede incluir un tinte tal como Ru/Bpy, Eu/Bpy o similares; o un metal tal como Ag y Cd.

En algunas realizaciones, una nanopartícula sujeta modificada comprende un núcleo y una coraza de sílice que recubre el núcleo. El grupo funcional se conjuga a la coraza de sílice, por ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.548.264. Numerosos métodos conocidos para unir grupos funcionales a sílice pueden adaptarse para su uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, Ralph K. Iler, The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry, Wiley-Interscience, NY, 1979; VanDerVoort, P. and Vansant, E. F., Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 19:2723-2752, 1996; and Immobilized Enzymes. Antigens, Antibodies, and Peptides: Preparation and Characterization, Howard H. Weetall (ed.), M. Dekker, NY, 1975. Un proceso típico para la agregación de grupos funcionales a nanopartículas recubiertas con sílice implica el tratamiento de las nanopartículas con un agente de silanización que reacciona con y se empareja con un grupo químico a la superficie de sílice de las nanopartículas. El grupo químico puede ser en sí mismo el grupo funcional o puede servir como un sustrato al cual los grupos funcionales pueden acoplarse.

Por ejemplo, en un método a modo de ejemplo, se preparan nanopartículas recubiertas con sílice tal como se ha descrito anteriormente y las superficies de las partículas se silanizan usando trimetilsililpropil-dietilenotriamina (DETA), un agente de silanización que une grupos de amina primarios a superficies de sílice. Un grupo funcional que puede acoplarse convalentemente a la superficie silanizada usando el método de bromuro de cianógeno (CNBR). Como ejemplo, el acoplamiento mediado por CNBR puede conseguirse mediante la suspensión de nanopartículas recubiertas con sílice previamente silanizadas con DETA en un tampón de carbonato de sodio de 2 M y mediante la ultra sonicación de la mezcla para crear una suspensión de partículas. Una solución de CNBR (por ejemplo, 2 g de CNBR/1 ml de acetonitrilo) se añaden a continuación a la suspensión de partículas para activar las nanopartículas. Después de lavar las nanopartículas con un tampón neutro (por ejemplo, PBS, pH 8) se añade una solución de anticuerpos a la suspensión de nanopartículas activada haciendo que los anticuerpos se unan a las nanopartículas. También se puede añadir una solución de glicina a las nanopartículas recubiertas de anticuerpos para bloquear cualquier sitio reaccionado restante.

En algunas realizaciones, la nanopartícula magnética está recubierta por dextrano. Las nanopartículas magnéticas están fabricadas usando cualquier proceso conocido. Por ejemplo, las partículas de hierro-dextrano magnéticas están preparadas mezclando 10 ml de 50 % (p/p) de Dextrano T-40 acuoso (Farmacia) con un volumen igual de una solución acuosa que contiene 1,51 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,64 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Mientras se agita, la mezcla se ajusta a un pH 10-11 mediante la adición gota a gota de 7,5 % (v/v) de NH_4OH calentado a 60-65 °C en un baño de agua durante 15 minutos. A continuación se retiran los agregados mediante 3 ciclos de centrifugación en una centrifugadora clínica de baja velocidad a 600 x g durante 5 minutos. Las partículas ferromagnéticas de hierro-dextrano se separan de dextrano no unido mediante cromatografía de filtración por gel sobre Sephacryl-300. Cinco ml de la mezcla de reacción se aplican a continuación a una columna de 2,5 x 33 cm y se eluye con 0,1 M de acetato de sodio y 0,15 M de NaCl a pH 6,5. Las partículas ferromagnéticas purificadas de hierro-dextrano recogidas en el volumen vacío tendrán una concentración de 7-10 mg/ml tal como se determinó mediante análisis de peso en seco. Molday y Mackenzie (1982) Journal of Immunological Methods 52:353-367. También véase (Xianqiao (2003) China Particology Vol.1, N.º2, 76-79). Las magnetonanopartículas resultantes pueden separarse basándose en el tamaño o propiedades magnéticas mediante separación de campo magnético de alto gradiente con una fuerza de campo

magnético apropiada.

En algunas realizaciones, las nanopartículas recubiertas pueden comprender un grupo epóxido. Las figuras 8 y 9 ilustran ejemplos de nanopartículas recubiertas que comprende un grupo epóxido. Para una nanopartícula recubierta con sílice, el recubrimiento de sílice puede comprender un grupo epóxido. Por ejemplo, puede usarse un epoxisilano. Para una nanopartícula recubierta con dextrano, el recubrimiento de dextrano puede comprender un grupo epóxido. Por ejemplo, puede producirse un dextrano modificado por epoxi mediante reacción de dextrano con reactivos que tienen grupos epóxidos. Por ejemplo, los grupos hidroxilo de dextrano que pueden reaccionar para formar dextrano sililado que comprenden grupos epóxidos.

El recubrimiento puede tener un espesor (por ejemplo, la distancia promedio desde la superficie externa de la partícula magnética del núcleo hasta la superficie externa del recubrimiento) de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 500 nm, por ejemplo, de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 5 nm, de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 15 nm, de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 20 nm, de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 25 nm, de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 30 nm, de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 50 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 70 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 125 nm, de aproximadamente 125 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 175 nm, de aproximadamente 175 nm a aproximadamente 200 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 225 nm, de aproximadamente 225 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 275 nm, de aproximadamente 275 nm a aproximadamente 300 nm.

La relación del espesor del recubrimiento respecto al diámetro de la partícula de núcleo magnética es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1000, por ejemplo, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:1,5, de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1:2, de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:2,5, de aproximadamente 1:2,5 a aproximadamente 1:5, de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:25, de aproximadamente 1:25 a aproximadamente 1:50, de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:100, de aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:250, de aproximadamente 1:250 a aproximadamente 1:500, de aproximadamente 1:500 a aproximadamente 1:750 o de aproximadamente 1:750 a aproximadamente 1:1000.

En algunas realizaciones, una nanopartícula magnética funcionalizada es de la fórmula: M-(L)-Z, los sitios de unión entre L y Z que tienen grupos funcionales covalentemente unidos, en los que M representa la partícula de núcleo magnética, L represente un grupo enlazador opcional y Z representa el grupo funcional. En otras realizaciones, una nanopartícula magnética funcionalizada es de la fórmula: M-S-(L)-Z, los sitios de unión entre S y L y L y Z que tienen grupos funcionales covalentemente unidos, en los que M representa la partícula de núcleo magnética, en los que S represente un sustrato biocompatible fijado a M, en los que M representa la partícula de núcleo magnética, L represente un grupo enlazador opcional y Z representa el grupo funcional. El grupo funcional de la composición de la invención es HODDNP. Otros grupos funcionales descritos en el presente documento incluyen restos que posibilitan la unión a péptidos beta-amiloideos (por ejemplo, péptido beta-amiloideo agregado) y/o NFT; restos que posibilitan la reticulación de BBB; agentes terapéuticos; y similares.

En algunas realizaciones, una nanopartícula magnética funcionalizada comprende dos o más grupos funcionales distintos unidos a la misma partícula de núcleo. También se describe una nanopartícula magnética funcionalizada de fórmula M-(L)-Z₁Z₂, o M-S-(L)-Z₁Z₂, en la que Z₁ y Z₂ son grupos funcionales distintos. Por ejemplo, Z₁ es HODDNP; y Z₂ es un agente terapéutico. En otro ejemplo, Z₁ es un resto que posibilita la reticulación de BBB; y Z₂ es HODDNP. Los restos de Z₁ y Z₂ están unidos independientemente a la partícula de núcleo o al polímero, directamente o mediante un enlazador. También se describe una nanopartícula magnética funcionalizada que comprende al menos un tercer resto funcional Z₃.

Las partículas de núcleo magnéticas consisten en magnetita, maghemita, ferritas de fórmula general MeOxFe₂O₃ en las que Me es un metal bivalente tal como cobalto, manganeso, hierro o de cobalto, hierro, níquel, carburo de hierro o nitrato de hierro, como se ha descrito anteriormente. Si está presente, el sustrato S se forma mediante compuestos tales como polisacáridos u oligosacáridos o derivados de los mismos, tales como dextrano, carboximetildextrano, almidón, almidón de dialdehído, quitina, alginato, celulosa, carboximetilcelulosa, proteínas o derivados de los mismos, tales como albúminas, los péptidos, se han propuesto polímeros sintéticos, tales como polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, polietilenimina, polimetacrilatos, ácidos carboxílicos bifuncionales y derivados de los mismos, tales como ácido mercaptosuccínico o ácidos hidrocarboxílicos.

El grupo enlazador L se forma mediante reacción de un compuesto tal como ácidos poli- y di-carboxílicos, ácidos polihidroxicarboxílicos, diaminas, aminoácidos, los péptidos, proteínas, lípidos, lipoproteínas, glucoproteínas, lectinas, oligosacáridos, polisacáridos, oligonucleótidos y derivados alquilados de los mismos y ácidos nucleicos (ADN, ARN, APN) y derivados alquilados de los mismos, presentes bien en forma monocatenaria o bicatenaria, cuyo compuesto incluye al menos dos grupos funcionales idénticos o distintos.

Una nanopartícula magnética funcionalizada es capaz de pasar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, una nanopartícula magnética funcionalizada puede comprender, unida a la nanopartícula o en una formulación con la nanopartícula o recubriendo la nanopartícula, uno o más polímeros. Entre los polímeros adecuados que facilitan la reticulación de la barrera hematoencefálica se incluye, pero sin limitarse a, tensioactivos tales como polisorbato (por ejemplo, Tween® 20, 40, 60 y 80); poloxámeros tales como Pluronic® F 68. En algunas realizaciones, una nanopartícula magnética funcionalizada se recubre con polisorbato tal como, por ejemplo, Tween® 80 (que es monooleato de polioxietileno-80-sorbitán), Tween® 40 que es monopalmitato de polioxietileno sorbitán); Tween® 60 (que es monoestearato de polioxietileno sorbitán); Tween® 20 (que es monolaurato de polioxietileno-20-sorbitán); monopalmitato de polioxietileno 20 sorbitán; monoestearato de polioxietileno 20 sorbitán; monooleato de polioxietileno 20 sorbitán; etc. También son adecuados para su uso polímeros solubles en agua, incluyendo, por ejemplo: poliéter, por ejemplo, óxidos de polialquileño tales como polietilén glicol ("PEG"), óxido de polietileno ("PEO"), óxido de polietileno oxideco-polipropileno ("PPO"), bloque de óxido de co-polietileno o copolímeros aleatorios y alcohol de polivinilo (PVA"); poli(vinil pirrolidinona) ("PVP"); poli(aminoácidos); dextrano y proteínas tales como albúmina. Los copolímeros en bloque son adecuados para su uso, por ejemplo, un copolímero tribloque de polietileno óxido-polipropileno óxido-polietileno-óxido (PEO-PPO-PEO) (por ejemplo, Pluronic® F68); véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.923.986. Otros métodos para cruzar la barrera hematoencefálica se tratan en diversas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Chen y col. (2004) Curr. Drug Delivery 1:361-376.

En algunas realizaciones, una MNP funcionalizada comprende uno o más agentes que posibilitan la evasión del sistema reticuloendotelial (RES). Entre los agentes que posibilitan la evasión del RES se incluye, pero sin limitarse a, un tensioactivo no iónico de copolímero en bloque tal como poloxamina, tal como poloxamina 508, poloxamina 908, poloxamina 1508, etc. En algunas realizaciones, una MNP funcionalizada comprende aproximadamente un 1 % de poloxamina.

Las nanopartículas también pueden transferirse a través de la barrera hematoencefálica (BBB) utilizando los canales de suministro específicos que están presentes en la BBB. Como un ejemplo no limitante, la unión de 2-deoxi glucosa a las nanopartículas hace que los canales de glucosa sean receptivos a estas partículas y ayuda en el suministro a través de la BBB. Otros mecanismos son la transcitosis y la diapédesis, con o sin la mediación de los canales presentes en la BBB.

Una nanopartícula magnética funcionalizada puede suministrarse al sistema nervioso central (CNS) usando técnicas neuroquirúrgicas. En el caso de pacientes gravemente enfermos tales como víctimas de accidente o aquellas que padecen varias formas de demencia, la intervención quirúrgica está justificada a pesar de los riesgos asociados. Por ejemplo, una nanopartícula magnética funcionalizada puede suministrarse mediante introducción directa física en el CNS, tal como inyección intraventricular o intratecal. La inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También pueden proporcionarse métodos de introducción mediante dispositivos recargables o biodegradables. Otro enfoque es la alteración de la barrera hematoencefálica por sustancias que aumentan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Entre los ejemplos se incluye infusión intra-arterial de agentes pobremente difusibles tales como manitol, fármacos que aumentan la permeabilidad cerebrovascular tal como etopósido o agentes vasoactivos tales como leucotrienos. Neuwelt y Rappoport (1984) Fed. Proc. 43:214-219; Baba y col. (1991) J. Cereb. Blood Flow Metab. 11:638-643; y Gennuso y col. (1993) Cancer Invest. 11:638-643.

Además, puede ser deseable administrar una nanopartícula magnética funcionalizada localmente en el área en necesidad de diagnóstico o tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, por infusión local durante una cirugía, por inyección, o por medio de un catéter o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras.

Una nanopartícula magnética funcionalizada también puede suministrarse usando técnicas farmacológicas incluyendo modificación química de modo que la nanopartícula magnética funcionalizada cruzará la barrera hematoencefálica. La nanopartícula magnética funcionalizada puede modificarse para aumentar la hidrofobicidad de la nanopartícula, disminuir la carga neta o peso molecular de la nanopartícula o modificar la nanopartícula, de modo que se parecerá a una transportada normalmente a través de la barrera hematoencefálica. Levin (1980) J. Med. Chem. 23:682-684; Pardridge (1991) in: Peptide Drug Delivery to the Brain; y Kostis y col. (1994) J. Clin. Pharmacol. 34:989-996.

La encapsulación de la nanopartícula magnética funcionalizada en un entorno hidrófobo tal como liposomas también es eficaz en el suministro de fármacos al CNS. Por ejemplo, el documento WO 91/04014 describe un sistema de suministro liposomal en el cual el fármaco se encapsula dentro de liposomas a los cuales las moléculas han sido agregadas que se transportan normalmente a través de la barrera hematoencefálica.

Otro método de formulación de una nanopartícula magnética funcionalizada para que pase a través de la barrera hematoencefálica es encapsular la nanopartícula magnética funcionalizada en una ciclodextrina. Puede emplearse cualquier ciclodextrina que pasa a través de la barrera hematoencefálica, incluyendo, pero sin limitación, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y derivados de los mismos. Véase, generalmente, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.017.566, 5.002.935 y 4.983.586. Tales composiciones pueden incluir un derivado de glicerol tal como se describe

en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.153.179.

En algunas realizaciones, una nanopartícula magnética funcionalizada es capaz de entrar en una célula en el cerebro, por ejemplo, cruzar una membrana celular y entrar en el citoplasma de la célula. Entre los mecanismos para entrar en una célula en el cerebro se incluyen, por ejemplo, la transcitosis y la diapédesis, con o sin mediación de canales de membrana apropiados.

Agentes terapéuticos

Una MNP funcionalizada puede incluir, además del grupo funcional que une depósitos β -amiloides y/o NFT, un agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico adecuado para tratar AD. Agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes para el tratamiento de AD, en los que tales agentes incluyen, inhibidores de la acetilcolinesterasa, incluyendo, Aricept (donepezilo), Exelon (rivastigmina), metrifonato, Razadyne (galantamina) y tacrina (Cognex); agentes antiinflamatorios no esteroideos, incluyendo, ibuprofeno e indometacina; inhibidores de ciclooxigenasa-2 (Cox2) tales como Celebrex; inhibidores de monoamina oxidasa, tales como Selegilina (Eldepryl o Deprenyl); y antagonistas de N-metil D-aspartato (NMDA) tales como Namenda (memantina).

Otro agente terapéutico adicional adecuado para el tratamiento de AD es un apoE4 "corrector de estructura" que reduce el dominio de interacción de apoE4. Los agentes que reducen el dominio de interacción de apoE4 incluyen, por ejemplo, un agente tal como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0073104; y en Ye y col. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18700.

Otro agente terapéutico adicional adecuado para el tratamiento de AD es un agente que inhibe la agregación de tau, por ejemplo, un derivado de naftoquinonas que inhibe la agregación de tau, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 7.605.179. Otro agente terapéutico adicional adecuado es un agente que inhibe la fosforilación de tau, por ejemplo, un derivado de 4-pirimidona-3-sustituida que inhibe la proteína de tau quinasa 1, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 7.572.793.

Composiciones

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden una MNP funcionalizada tal como se define en la reivindicación 1. Las composiciones que comprenden una nanopartícula magnética funcionalizada sujeto incluirán una o más de los siguientes: una sal; un tampón; un agente de ajuste de pH; un detergente no iónico; un inhibidor de la proteasa; un inhibidor de nucleasa.

Una composición farmacéutica que comprende una MNP funcionalizada comprenderá uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo de una composición, permite que el ingrediente retenga la actividad biológica y sin causar reacciones perjudiciales con el sistema inmune del sujeto u otra función fisiológica. Los ejemplos incluyen, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsión aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Diluyentes a modo de ejemplo para la administración vía pulverización o parenteral son tampón fosfato salino o tampón salino normal (0,9 %). Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Capítulo 43, 14ª edición, Mack Publishing Co., Easton PA 18042, USA). Excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito ampliamente en varias publicaciones, incluyendo, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Remington's Pharmaceutical Sciences, 14ª edición o última edición, Mack Publishing Co., Easton PA 18042, Estados Unidos; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel y col., eds., 7ª ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe y col., eds., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

Puede formularse una nanopartícula magnética funcionalizada en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionando en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos convencionales, tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

MÉTODOS DE FORMACIÓN DE IMÁGENES

Una MNP funcionalizada puede usarse para detectar y cuantificar depósitos amiloideos y/o NFT en el cerebro de un mamífero vivo, por ejemplo, un ser humano, un animal no humano o un modelo de animal no humano de una enfermedad asociada con o resultante de depósitos β -amiloides y/o NFT. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1 que comprende una MNP funcionalizada se administra a un mamífero vivo. Cualquier depósito β -amiloideo (por ejemplo, β -amiloideo agregado tal como puede asociarse con ovillos neurofibrilares) presente en el cerebro puede visualizarse usando formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o

cualquier otro método de formación de imágenes apropiado. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos de detección y cuantificación de epósitos amiloides y/o NFT en el cerebro de un mamífero vivo. Los métodos implican generalmente la administración a un mamífero de una cantidad diagnósticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una MNP funcionalizada; y b) formar imágenes del tejido cerebral mediante MRI. La MNP funcionalizada que se ha administrado se deja distribuir en el tejido cerebral y cualquier MNP funcionalizada unida a péptidos β -amiloides agregados y/o NFT puede formarse mediante imágenes usando MRI. Un aumento en la unión de MNP funcionalizada al tejido cerebral en comparación con un nivel de control normal de unión indica que el mamífero está padeciendo o tiene riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer.

Una MNP funcionalizada proporciona contraste en los tiempos T2, T2* y T1 de tejidos afectados (por ejemplos, tejidos cerebrales con depósitos β -amiloides) para hacer que los tejidos sean visibles a la MRI. Las regiones de interés a someter a formación de imágenes incluyen, por ejemplo, el hipocampo, el córtex y el mesencéfalo.

Puede usarse una MNP funcionalizada para formar imágenes de depósitos β -amiloides (por ejemplo, proteína β -amiloidea) y/o NFT en el cerebro de un modelo animal no humano de enfermedad de Alzheimer (AD), por ejemplo, para fines de investigación. Modelos animales no humanos adecuados de AD incluyen un ratón transgénico que comprende un transgén mutante de proteína precursora del amiloide humana (hAPP); un ratón transgénico que comprende un transgén de presenilina1 o presenilina2; y similares. Véase, por ejemplo, Götz y col. (2004) *Mol. Psychiatry* 9:664; Götz and Ittner (2008) *Nature Reviews* 9:532.

Por ejemplo, un fármaco experimental para el tratamiento de AD puede administrarse a un modelo animal no humano de AD; y una MNP funcionalizada puede usarse para determinar el efecto del fármaco experimental sobre la cantidad de depósitos β -amiloides y/o NFT en el cerebro del modelo animal no humano.

Al llevar a cabo un método de formación de imágenes sujeto, puede administrarse una MNP funcionalizada a un individuo mediante cualquiera de varias vías de administración, incluyendo vías parenterales y enterales. Las vías adecuadas de administración incluyen, por ejemplo, intravenosa, oral, rectal, vaginal, nasal, ocular, intratecal, intracraneal, intramuscular, etc.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Tal como se ha señalado anteriormente, en algunas realizaciones, una MNP funcionalizada puede incluir, además de un resto (grupo) funcional que une depósitos β -amiloides y/o NFT, un agente terapéutico. Tal MNP funcionalizada puede usarse en la formación de imágenes y/o tratamiento de AD.

Agentes terapéuticos adecuados incluyen agentes para el tratamiento de AD, en los que tales agentes incluyen, inhibidores de la acetilcolinesterasa, incluyendo, Aricept (donepezilo), Exelon (rivastigmina), metrifonato y tacrina (Cognex); agentes antiinflamatorios no esteroideos, incluyendo, ibuprofeno e indometacina; inhibidores de ciclooxigenasa-2 (Cox2) tales como Celebrex; e inhibidores de monoamina oxidasa, tales como Selegilina (Eldepryl o Deprenyl).

Otro agente terapéutico adicional adecuado para el tratamiento de AD es un apoE4 "corrector de estructura" que reduce el dominio de interacción de apoE4. Los agentes que reducen el dominio de interacción de apoE4 incluyen, por ejemplo, un agente tal como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0073104; y en Ye y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18700.

Otro agente terapéutico adicional adecuado para el tratamiento de AD es un agente que inhibe la agregación de tau, por ejemplo, un derivado de naftoquinonas que inhibe la agregación de tau, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 7.605.179. Otro agente terapéutico adicional adecuado es un agente que inhibe la fosforilación de tau, por ejemplo, un derivado de 4-pirimidona-3-sustituida que inhibe la proteína de tau quinasa 1, como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 7.572.793.

Al llevar a cabo un método de tratamiento, puede administrarse una MNP funcionalizada mediante cualquiera de varias vías de administración, incluyendo vías parenterales y enterales. Las vías adecuadas de administración incluyen, por ejemplo, intravenosa, oral, rectal, vaginal, nasal, ocular, intratecal, intracraneal, intramuscular, etc.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención.

Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. Salvo que se indique de otra manera, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta. Pueden emplearse abreviaturas convencionales, por ejemplo, pb, pare(s) de base(s); kb, kilobase(s); pl, picolitro(s); s o seg, segundo(s);

min, minuto(s); h, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, pare(s) de base(s); nt, nucleótido(s); i.m., por vía intramuscular; i.p., por vía intraperitoneal; s.c., por vía subcutánea; y similares.

Ejemplo 1: Preparación de MNP funcionalizadas

MNP conjugadas con HODDNP ("DNP-MNP")

Se administraron MNP conjugadas con HODDNP a ratas no tratadas previamente (sin AD) y a un modelo de rata de AD. Los datos se muestran en las Figuras 1-6.

Figuras 1A y 1B. Se muestran imágenes de MR (resonancia magnética (T2, TR 6000 milisegundos (ms), TE 10-120 ms, 12 resonancias) de rata no tratada previamente (sin AD). La figura 1A muestra la imagen de MR de valor basal (pre-contraste) de un corte representativo. La figura 1b muestra la imágenes de MR post-contraste del mismo corte. La comparación de los valores T2 cuantitativos de regiones volumétricas de interés (ROI) (en los que las ROI incluyen el hipocampo, córtex y mesencéfalo) en las exploraciones de valor basal (figura 1A) y post-contraste (Figura 1B) no mostró un aumento de contraste significativo ($p>0,05$) en este animal no tratado previamente después de la inyección con DNP-MNP (también denominado "HODDNP-MNP").

La Tabla 1 muestra los valores T2 cuantitativos ("Base T2 (ms)") de las regiones de interés (ROI) (en los que las ROI incluyen el hipocampo, córtex y mesencéfalo) en la exploración de valor basal. La Tabla 1 muestra los valores T2 cuantitativos ("Post T2") de las mismas regiones de interés en la misma rata 1,5 horas después de la inyección intravenosa (i.v; vena caudal) de HODDNP-MNP.

Tabla 1

ROI	Base T2 (ms)	Post T2
Hipocampo	55,0±0,2	51,3±0,3
córtex	53,0±0,3	48,6±0,2
mesencéfalo	50,7±0,4	46,5 ± 0,4

Figuras 2A y 2B. Se muestran imágenes de MR (T2, TR 6000 ms, TE 10-120 ms, 12 resonancias) de una rata de 1 año de edad que es un modelo genético de AD (modelo genético triple de placas de amiloide- β (A β). La figura 2A muestra la imagen de MR de valor basal (pre-contraste) de un corte representativo en esta rata. La figura 2B muestra la imagen de MR post-contraste del mismo corte, 2,5 horas después de la inyección con contraste. La comparación de valores T2 cuantitativos de las ROI volumétricas (hipocampo, córtex y mesencéfalo) en las exploraciones de valor basal (figura 2A) y post-contraste (Figura 2B) mostraron un aumento de contraste significativo ($P<0,05$) en todas las ROI después de la inyección con DNP-MNP. El aumento de contraste fue más prominente en el hipocampo, seguido por el córtex.

La Tabla 2 muestra los valores T2 cuantitativos ("Base T2 (ms)") de las ROI (hipocampo, córtex y mesencéfalo) en la exploración de valor basal. La Tabla 2 muestra los valores T2 cuantitativos ("Post T2") de las mismas ROI en la misma rata 2,5 horas después de la inyección i.v. (vena caudal) de HODDNP-MNP.

Tabla 2

ROI	Base T2 (ms)	Post T2
hipocampo	56,2±0,3	48,560,3
córtex	52,4±0,3	45,3±0,3
mesencéfalo	49,4±0,4	44,1±0,5

Figuras 3A y 3B. Se muestran imágenes de MR (T2, TR 6000 ms, TE 10-120 ms, 12 resonancias) de una segunda rata de 1 año de edad que es un modelo genético de AD (modelo genético triple de placas A β). La figura 3A muestra la imagen de MR de valor basal (pre-contraste) de un corte representativo en esta rata. La figura 3B muestra la imagen de MR post-contraste del mismo corte, 2,5 horas después de la inyección con el contraste. La comparación de valores T2 de las ROI volumétricas (hipocampo, córtex y mesencéfalo) en las exploraciones de valor basal (figura 3A) y post-contraste (Figura 3B) mostraron un aumento de contraste significativo ($P<0,05$) en todas las ROI después de la inyección con DNP-MNP. El aumento de contraste fue más prominente en el hipocampo, seguido por el córtex.

La Tabla 3 muestra los valores T2 cuantitativos ("Base T2 (ms)") de las ROI (hipocampo, córtex y mesencéfalo) en la exploración de valor basal. La Tabla 3 muestra los valores T2 cuantitativos ("Post T2") de las mismas ROI en la misma rata 2,5 horas después de la inyección i.v. (vena caudal) de HODDNP-MNP.

Tabla 3

ROI	Base T2 (ms)	Post T2
hipocampo	65,8±0,4	51,8±0,4
córtex	61,0±0,4	48,8±0,3
mesencéfalo	61,0±0,5	46,5±0,5

Figuras 4A-C. Un corte de MRI representativo de un modelo de rata transgénico de AD se muestra en la Figura 4A. El área en recuadro correspondiente (hipocampo) se muestra sobre una sección histológica teñida en la Figura 4B. El recuadro muestra la presencia de placa prominente en el hipocampo. Se observó más presencia de placa difusa (Figura 4C) en todas las áreas del cerebro. Estos resultados confirman que la mejora de contraste con HODDNP-MNP se produce con la presencia de placas β -amiloideas, que se asocian con AD.

Figuras 5A-D. Se muestra presencia de placa difusa (Figura 5A) en el hipocampo. La tinción de hierro de Perl en cortes adyacentes muestra la presencia de DNP-MNP en áreas que contienen placas (Figuras 5B-D).

Figuras 6A y 6B. Se muestra la tinción de Perl aumentada con DAB del corte de cerebro de rata transgénica (inyección intravenosa post DNP-MNP, a través de la vena caudal) se muestra en la Figura 6A. DNP-MNP cruzó la BBB y está presente en el tejido cerebral intracelular (flechas) así como extracelular. La tinción de Perl aumentada por DAB del animal de control no tratado previamente (sin inyección de contraste) (Figura 6B) no muestra tinción presente en la misma área del cerebro (córtex entorrinal) se muestra en la figura 6A.

HODDNP puede conjugarse covalentemente a MNP epoxi a través del grupo hidroxilo de HODDNP. Un ejemplo de un método de conjugación se representa en la **Figura 7**.

MNP conjugadas con PIB-2

PIB-2 puede conjugarse covalentemente a MNP epoxi a través del nitrógeno amino de PIB-2. Un ejemplo de tal método se representa en la **Figura 8**.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 a) una nanopartícula magnética funcionalizada (MNP) de fórmula M-(L)-Z or M-S-(L)-Z en la que M es un núcleo magnético, S es un polímero, L es un enlazador opcional y Z es un grupo funcional que une proteína β -amiloidea agregada y/o ovillos neurofibrilares, en donde dicho grupo funcional está acoplado opcionalmente a través del enlazador, si está presente, al núcleo magnético o al polímero S, en donde dicha nanopartícula magnética funcionalizada es capaz, cuando se introduce en el torrente sanguíneo de un sujeto mamífero, de cruzar la
 - 10 barrera hematoencefálica de un sujeto mamífero, en donde el grupo funcional es 2-(1-{6-[(2-hidroxietil)(metil)amino]-2-naftil}etilideno)malononitrilo (HODDNP); y
 - b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el grupo funcional de HODDNP está acoplado al núcleo magnético a través del grupo hidroxilo de HODDNP.
3. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la MNP funcionalizada comprende además un agente terapéutico.
- 20 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la MNP funcionalizada comprende, unida a la nanopartícula o en una formulación con la nanopartícula o recubriendo la nanopartícula, uno o más polímeros.
- 25 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 en la que dicho disolvente es dextrano, albúmina o un tensioactivo.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el tensioactivo es monooleato de polioxietileno sorbitán, monopalmitato de polioxietileno sorbitán, monoestearato de polioxietileno sorbitán, monolaurato de polioxietileno sorbitán, un copolímero en bloque de óxido de polietileno y óxido de polipropileno o una poloxamina.
- 30 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de detección de depósitos β -amiloideos y/u ovillos neurofibrilares en el cerebro de un mamífero vivo, comprendiendo el método: a) administrar al mamífero una cantidad diagnósticamente eficaz de dicha composición farmacéutica; b) dejar que la MNP funcionalizada se distribuya en el tejido cerebral; y c) obtener imágenes del tejido cerebral a través
 - 35 de formación de imágenes de resonancia magnética, en donde el aumento en la unión de MNP funcionalizada al tejido cerebral en comparación con un nivel de control normal de unión indica la presencia de depósitos β -amiloideos y/u ovillos neurofibrilares en el cerebro.
- 40 8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para detectar Enfermedad de Alzheimer o una predisposición a la misma en el cerebro del mamífero vivo.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 en donde la combinación se administra mediante inyección intravenosa.
- 45 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7, 8 o 9 en donde el mamífero vivo es un ser humano.

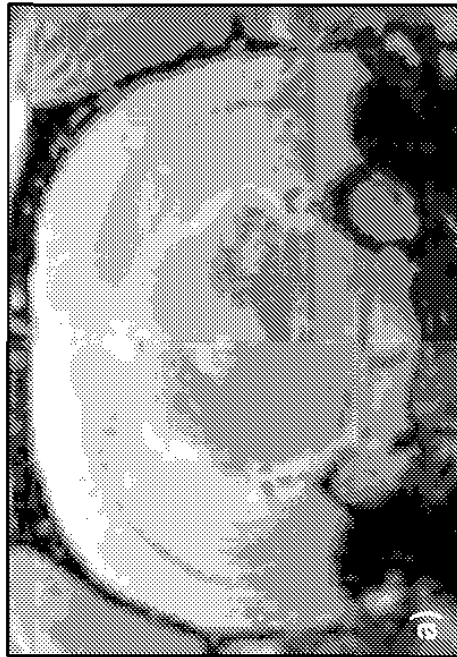


FIG. 1



FIG. 2

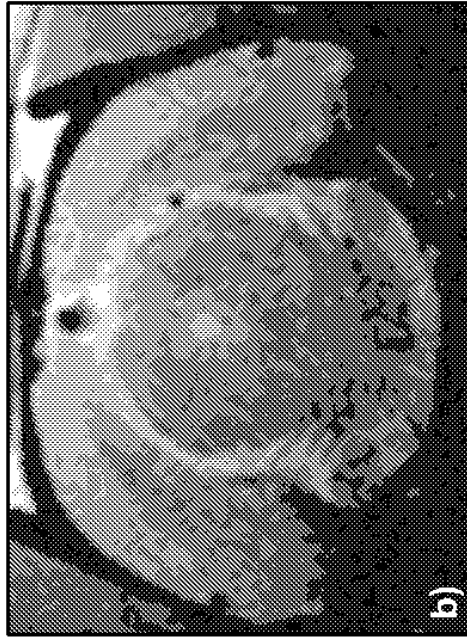


FIG. 3

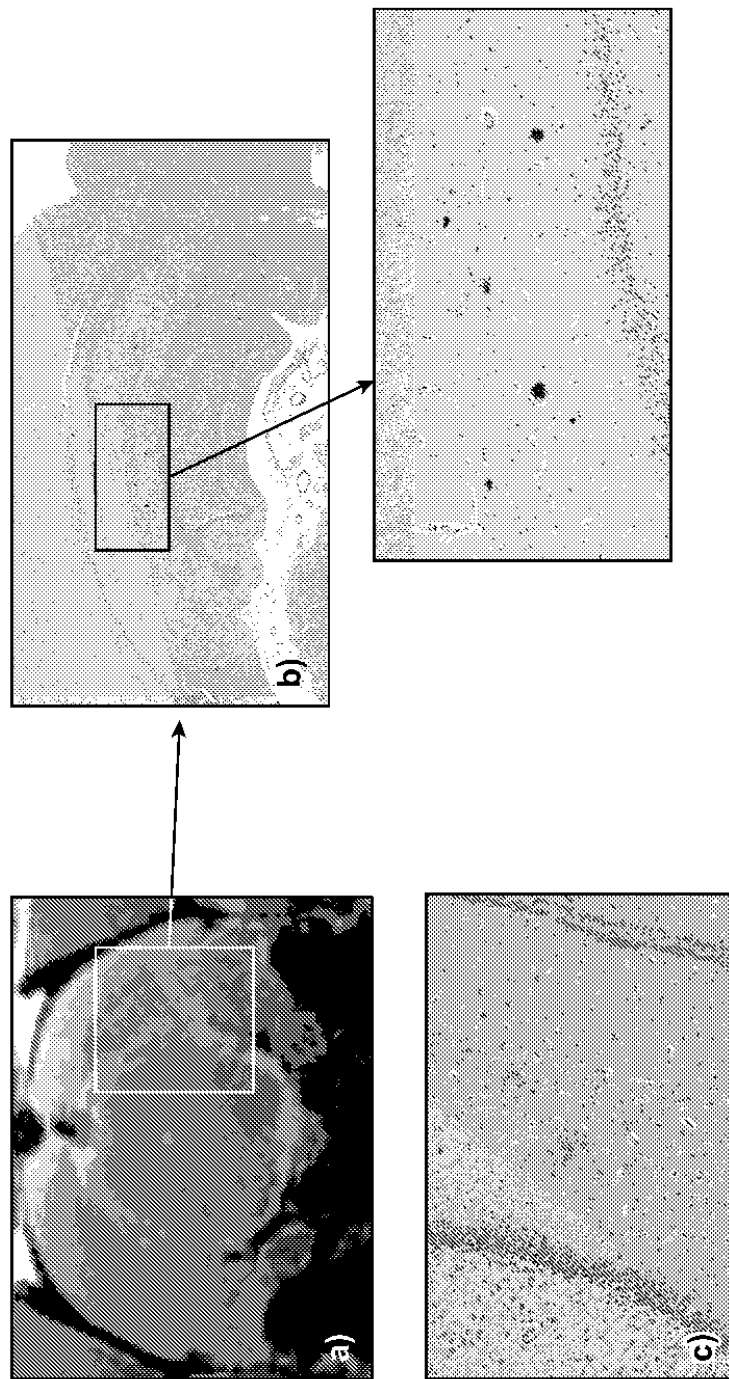


FIG. 4

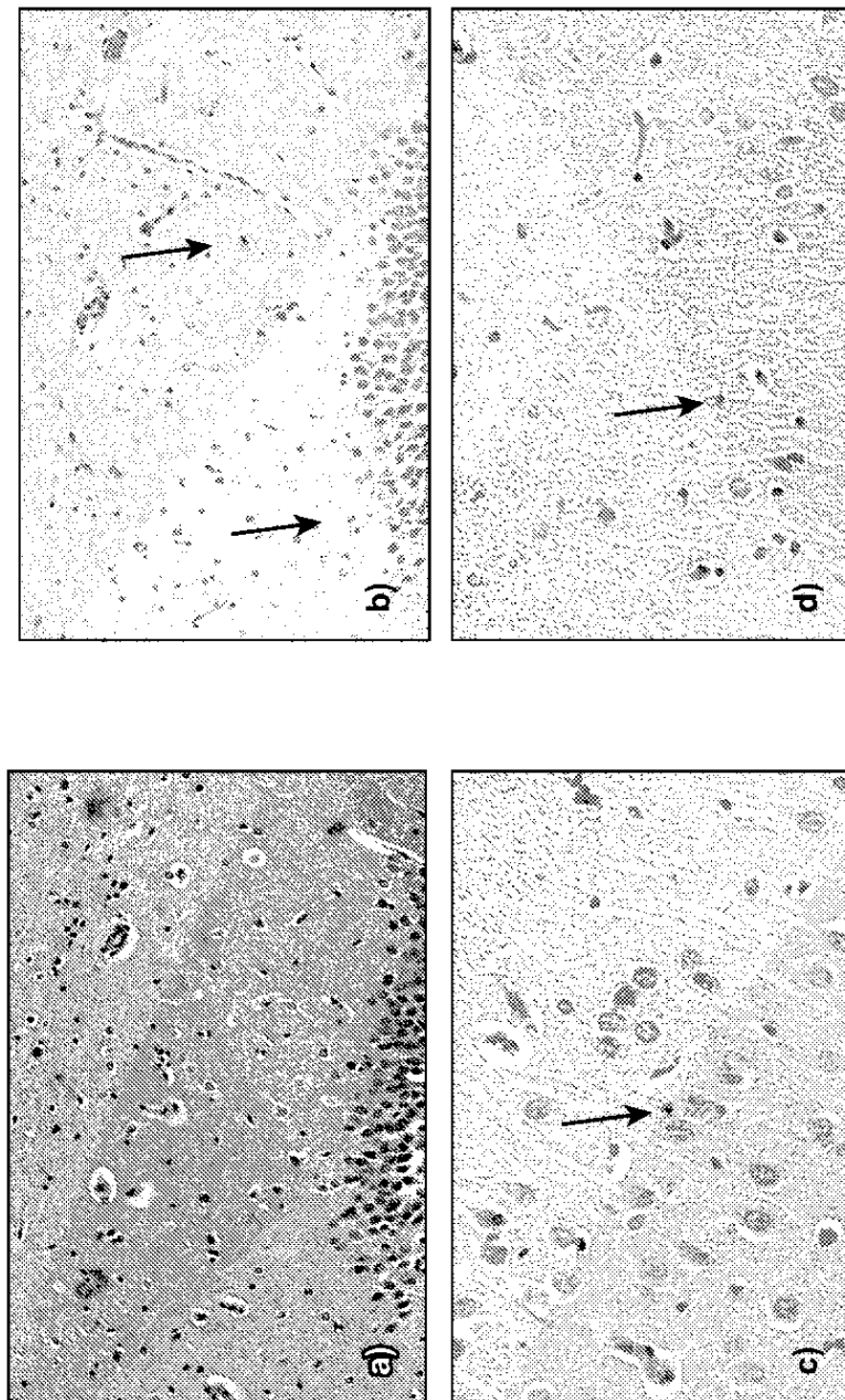


FIG. 5

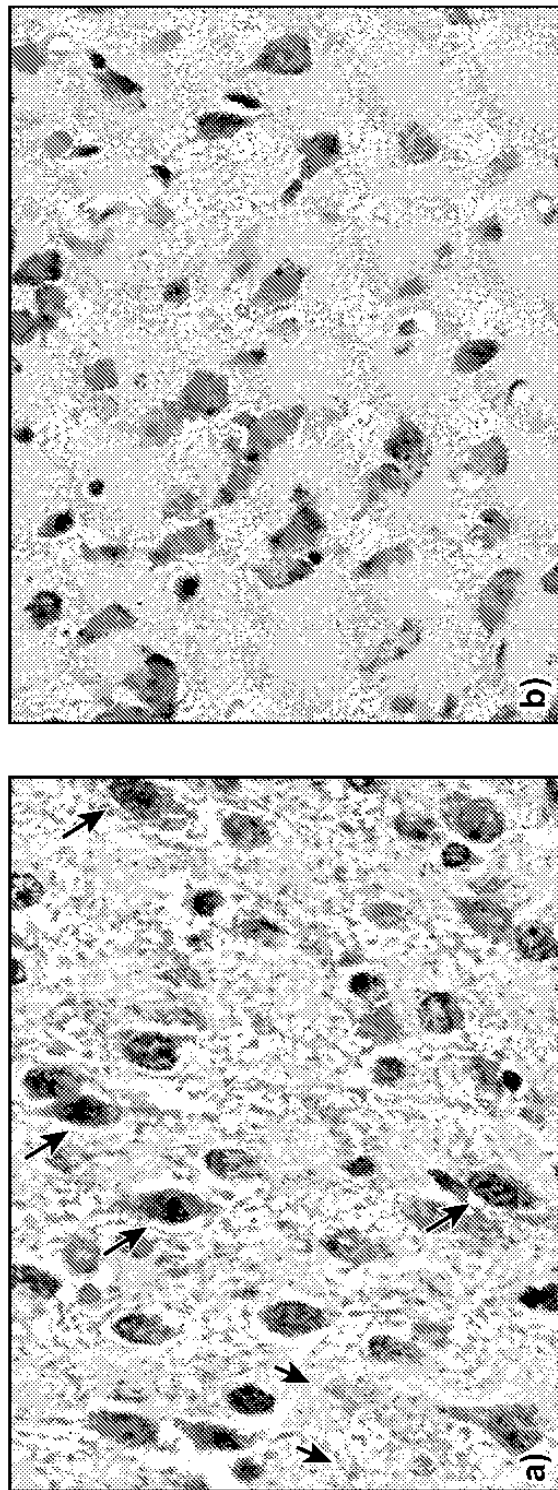


FIG. 6

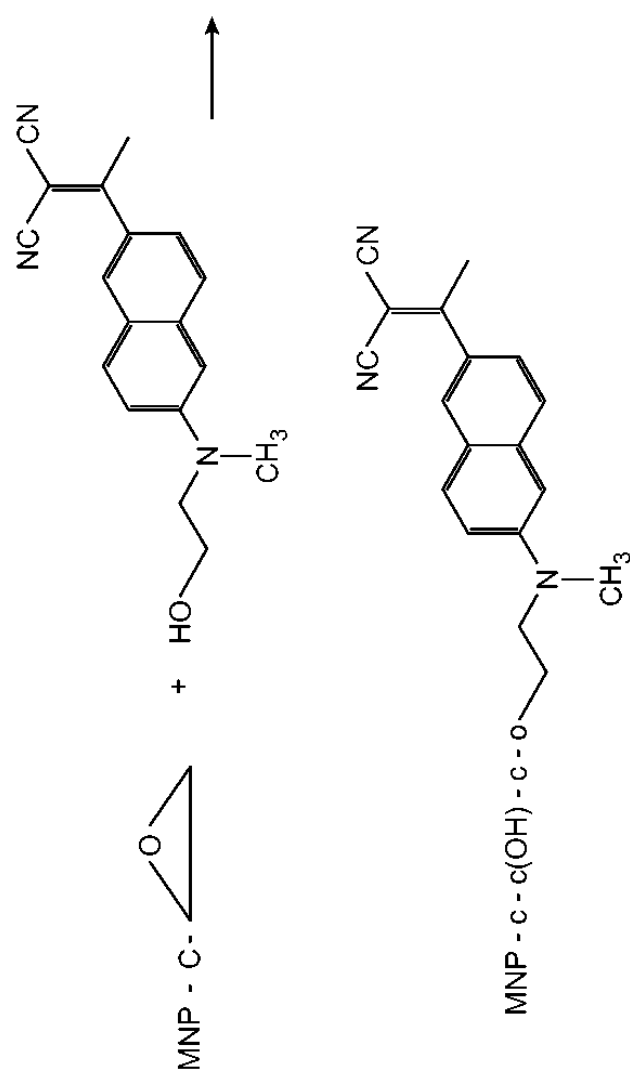


FIG. 7

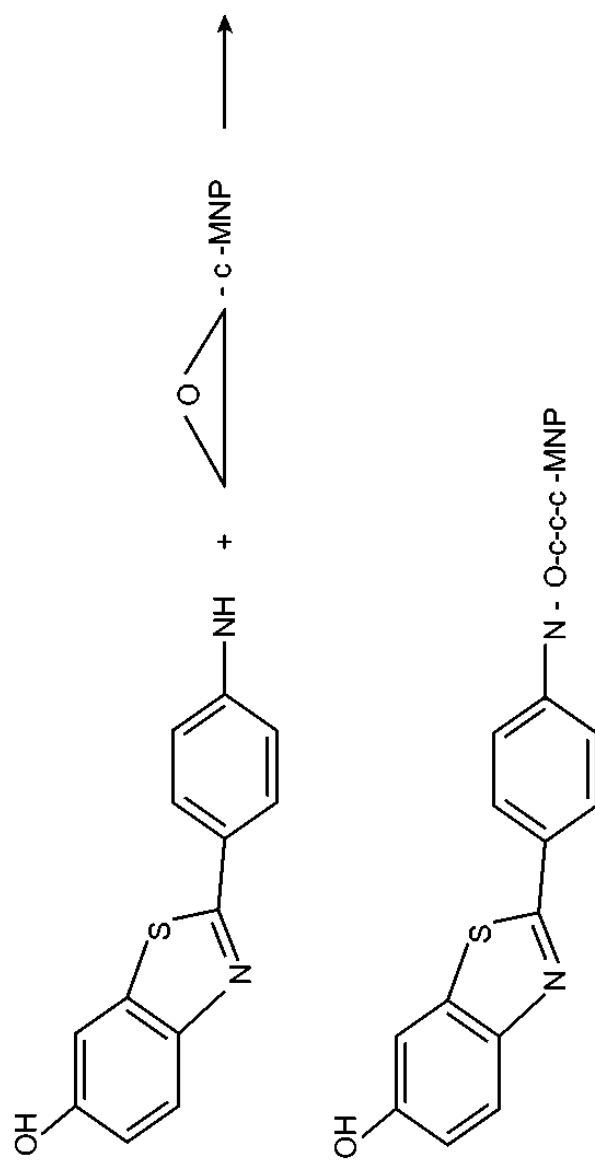


FIG. 8