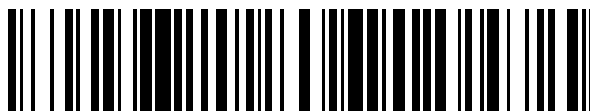


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 561**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54	(2007.01) B82Y 5/00	(2011.01)
A61K 47/60	(2007.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 47/69	(2007.01) A61P 25/28	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61K 31/06	(2006.01)	
A61K 31/12	(2006.01)	
A61K 31/355	(2006.01)	
A61K 31/416	(2006.01)	
A61K 31/66	(2006.01)	
A61K 9/51	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/US2013/026299**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123298**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13749000 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2814496**

54 Título: **Nanopartículas para el transporte mitocondrial de agentes**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600088 P

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

28.05.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (100.0%)
Boyd Graduate Studies Research Center
Athens, GA 30602-7411, US**

72 Inventor/es:

**DHAR, SHANTA y
MARRACHE, SEAN M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 669 561 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 para el transporte mitocondrial de agentes

5 Campo

La presente divulgación se refiere a nanopartículas configuradas para transportar agentes a mitocondrias y a usos de las mismas, incluyendo usos diagnósticos y terapéuticos. En particular, las reivindicaciones se refieren una nanopartícula dirigida a mitocondrias, que comprende: un polímero director de poli(ácido D.L-láctico-co-glicólico)-b-poli(etilenglicol) catión trifenilfosfonio (PLGA-b-PEG-TPP); y polímero de PLGA-b-PEG-OH o PLGA-COOH; donde la nanopartícula tiene un diámetro de 70 a 330 nanómetros y tiene un potencial zeta de más de 0 mV, y donde la nanopartícula comprende además un agente terapéutico, así como el uso de la misma para tratar un paciente con riesgo o que padece una enfermedad asociada a disfunción mitocondrial.

15 Antecedentes

La disfunción mitocondrial puede desempeñar un papel en una diversidad de trastornos, incluyendo cáncer, enfermedad neurodegenerativa y neuromuscular, obesidad y diabetes. Un reto principal en el tratamiento de tales enfermedades no es el desarrollo de fármacos eficaces, sino la distribución de los fármacos a las mitocondrias. La capacidad para suministrar fármacos a mitocondrias en cantidades suficientes mientras se evita toxicidad sigue siendo un reto. Sharma et ál. desvelan en Biomacromolecules, 13(1), 2012, 239-252 polímeros de estrella mikto Brazo poliméricos de sombrero a partir de nanomicelas con un PEG corona hidrófilo y un núcleo PCL (policaprolactona) hidrófobo. TPP se usa como resto director que suministra las nanopartículas que contienen CoQ10 a las mitocondrias.

25 Sumario

La presente divulgación describe, entre otras cosas, nanopartículas configuradas para transportar agentes a mitocondrias. Al transportar agentes a mitocondrias, en lugar del citoplasma u otros orgánulos de las células, la concentración relativa de los agentes en las mitocondrias puede aumentar para mejorar el efecto del agente en las mitocondrias mientras se disminuye el efecto en otras ubicaciones. Por consiguiente, la eficacia puede aumentarse mientras pueden disminuirse efectos secundarios o toxicidad. Los agentes a suministrar a las mitocondrias pueden ser agentes terapéuticos, agentes diagnósticos, o similares.

Como se describe en el presente documento, el tamaño y densidad superficial de carga de la nanopartícula afecta a la capacidad de dirigir la nanopartícula a las mitocondrias. Por ejemplo, las nanopartículas que tienen diámetros de aproximadamente 200 nanómetros o menos se encuentra que se acumulan más fácilmente en las mitocondrias que nanopartículas que tienen diámetros mayores de aproximadamente 200 nanómetros. Las nanopartículas que tienen un potencial zeta de aproximadamente 0 o mayor se encuentra que se acumulan más fácilmente en las mitocondrias que nanopartículas que tienen potenciales zeta de menos de aproximadamente cero.

En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento incluyen un núcleo hidrófobo y una capa hidrófila que rodea al núcleo. Las nanopartículas también incluyen un resto director mitocondrial. Las nanopartículas tienen un diámetro de 70 a 330 nanómetros y tienen un potencial zeta de más de 0 mM, tal como aproximadamente 1 mV o mayor, aproximadamente 7 mV o mayor, aproximadamente 20 mV o mayor, aproximadamente 25 mV o mayor, aproximadamente 30 mV o mayor, aproximadamente 34 mV o mayor, aproximadamente 35 mV o mayor, o similar. Tales nanopartículas pueden permitir dirigir los agentes terapéuticos asociados a las nanopartículas a mitocondrias, que puede permitir el tratamiento de enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial.

Las ventajas de una o más de las diversas realizaciones presentadas en el presente documento sobre nanopartículas anteriores, metodologías de formación de imágenes, modalidades de tratamiento, o similares serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia basándose en la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con las figuras acompañantes. La materia objeto que no se incluye en el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que presenta esquemas de reacción ilustrativos para la síntesis de PLGA-b-PEG-OH, PLGA-b-PEG-TPP, y polímero conjugado a QD.

La Figura 2 es un dibujo esquemático que ilustra la construcción de nanopartículas dirigidas y no dirigidas mezclando PLGA-b-PEG-OH y PLGA-COOH con PLGA-b-PEG-TPP, con agentes terapéuticos de acción mitocondrial usados como cargas.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la variación de tamaño y potencial zeta en nanopartículas mezcladas de PLGA-b-PEG-TPP y PLGA-COOH. * Las nanopartículas de 100% de PLGA-COOH son inestables, y el diámetro de nanopartícula varía de 700 nm a 10 μ m dependiendo de la preparación de lote.

La Figura 4 es un gráfico de barras que muestra la variación del potencial zeta en nanopartículas mezclando PLGA-b-PEG-TPP con PLGA-b-PEG-OH.

Las Figuras 5A-F son imágenes de TEM de nanopartículas mezcladas dirigidas y no dirigidas. Todas las muestras de TEM excepto las nanopartículas mezcladas QD se tiñeron con solución acuosa estéril al 2% (p/vol) de acetato de uranilo durante 15 min antes de formación de imágenes.

Las Figuras 6A-B son gráficos de barras que muestran la secreción de IL-6 y TNF- α en los medios con nanopartículas de carga variada (A) y tamaño variado (A) (0,5 mg/ml) después de 12 h en macrófagos RAW 264.7.

Las Figuras 7A-B son imágenes de células que muestran localización subcelular de nanopartículas mezcladas PLGA-b-PEG-TPP/PLGA-b-PEG-QD dirigida fluorescente roja (A) y nontargeted PLGA-b-PEG-OH/PLGA-b-PEG-QD no dirigida (B). Se expusieron células HeLa a nanopartículas dirigidas (diámetro, 79 nm; potencial zeta, 27,4 mV) y nanopartículas no dirigidas (diámetro, 79 nm; potencial zeta, -26,5 mV) a 10 μ M durante 4 h. Las células se tiñeron después con el marcador mitocondrial MitoTracker Green (Invitrogen), se fijaron, y se observaron con microscopio de fluorescencia de campo amplio. Las imágenes fusionadas e imágenes de mayor ampliación muestran superposición eficaz de tinción mitocondrial (verde) en nanopartículas dirigidas (rojo). No se observó superposición significativa con nanopartículas no dirigidas.

Las Figuras 8A-B son imágenes confocales de captación dependiente del tiempo de nanopartículas mezcladas dirigidas PLGA-b-PEG-TPP/PLGA-b-PEGQD (A) y nanopartículas mezcladas no dirigidas PLGA-b-PEG-OH/PLGA-b-PEG-QD (B) en células HeLa. Los lisosomas se tiñeron con CellLight lisosomas-GFP, BacMam 2.0 (Life Technologies) (verde).

Las Figuras 9A-D son gráficos de barras que muestran la distribución mitocondrial y citosólica de nanopartículas mezcladas dirigidas PLGA-b-PEGTPP/PLGA-b-PEG-QD en células HeLa por análisis ICP-MS. (A) Efecto del tamaño en la captación de nanopartículas.

(B) Captación celular global de nanopartículas de tamaño variable. (C) Efecto de potencial zeta en el tráfico celular de nanopartículas. (D) Captación celular global de nanopartículas de potencial zeta variable.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra el efecto de la supervivencia porcentual de células de neuroblastoma IMR-32 después de tratamiento con nanopartículas de curcumina dirigidas, nanopartículas de curcumina no dirigidas, y curcumina libre contra citotoxicidad inducida A β . El asterisco representa diferencias significativas en nanopartículas de curcumina dirigidas, nanopartículas de curcumina no dirigidas, y curcumina libre según ANOVA de una vía con ensayo *post hoc* de Tukey; $P < 0,001$.

Las Figuras 11A-C son gráficos de barras que muestran perfiles de citotoxicidad de nanopartículas dirigidas de LND, nanopartículas no dirigidas de LND, LND libre (A); nanopartículas dirigidas de α -TOS, nanopartículas no dirigidas de α -TOS, α -TOS libre en células HeLa (B); y nanopartículas dirigidas vacías, y nanopartículas no dirigidas vacías en células HeLa (C).

Las Figuras 12A-D son gráficos de barras que muestran que preadipocitos de ratón 3T3-L1 se diferenciaron en adipocitos en presencia de 1 μ M (A), 4 μ M (B), 25 μ M (C), o 100 μ M (D) de nanopartículas dirigidas de 2,4-DNP, nanopartículas no dirigidas de 2,4-DNP, y 2,4-DNP libre durante 7 d. Se usaron células no diferenciadas y células completamente diferenciadas como controles. Se tiñeron lípidos intracelulares con AdipoRed (Lonza), y se calculó la acumulación lipídica porcentual. La inhibición de diferenciación de adipocitos se muestra para el día 7. Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA de una vía con ensayo *post hoc* de Tukey. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. Se obtuvieron resultados similares de dos experimentos independientes. ns, no significativo.

La Figura 13 es un gráfico que muestra los resultados presentados en las Figuras 12A-D en un formato diferente.

La Figura 14 es un gráfico que muestra biodistribución y farmacocinética *in vivo* de nanopartículas dirigidas en ratas.

La Figura 15 es una tabla que muestra datos farmacocinéticos de nanopartículas dirigidas en ratas.

Los dibujos esquemáticos no son necesariamente a escala. Se usan números similares en las figuras para referirse a componentes similares, etapas y similares. Sin embargo, se entenderá que el uso de un número para referirse a un componente en una figura dada no pretende limitar el componente en otra figura etiquetada con el

mismo número. Además, el uso de diferentes números para referirse a componentes no pretende indicar que componentes numerados diferentes puedan no ser iguales o similares.

Descripción detallada

- 5 En la descripción detallada siguiente, se hace referencia a las figuras acompañantes que forman parte de la misma, y en las que se muestran a modo de ilustración varias realizaciones específicas de dispositivos, sistemas y métodos.
- 10 Todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen significados usados habitualmente en la técnica a menos que se especifique otra cosa. Las definiciones proporcionadas en el presente documento son para facilitar la comprensión de cientos términos usados frecuentemente en el presente documento y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.
- 15 Tal como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen realizaciones que tienen referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Tal como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "o" se emplea generalmente en su sentido incluyendo "y/o" a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.
- 20 Como se usa en el presente documento, "tener", "teniendo", "incluir", "incluyendo", "comprender", "comprendiendo" o similar se usan en su sentido amplio, y significan generalmente "incluyendo, pero sin limitación". Se entenderá que "consistiendo básicamente en", "consistiendo en", y similares se subsuman en "comprendiendo" y similares.
- 25 Como se usa en el presente documento, "enfermedad" significa una afección de un ser vivo o una o más de sus partes que perjudica el funcionamiento normal. Como se usa en el presente documento, el término enfermedad incluye términos tales como enfermedad, trastorno, afección, disfunción y similares.
- 30 Como se usa en el presente documento, "tratar" o similar significa curar, prevenir, o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad.
- 35 Como se usa en el presente documento, una enfermedad asociada a una disfunción mitocondrial es una enfermedad que puede tratarse por acción terapéutica en o dentro de las mitocondrias, tal como suministrando un agente terapéutico a las mitocondrias y el agente interactuando con una o más moléculas sobre o en las mitocondrias.
- Como se usa en el presente documento, un compuesto que es "hidrófobo" es un compuesto que es insoluble en agua o tiene una solubilidad en agua menor de 1 miligramo/litro.
- Como se usa en el presente documento un compuesto que es "hidrófilo" es un compuesto que es soluble en agua o tiene una solubilidad en agua mayor de 1 miligramo/litro.
- 40 Como se usa en el presente documento, "unir", "unido", o similar significa que las entidades químicas están unidas mediante un tipo adecuado de enlace, tal como un enlace covalente, un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o similar. "Unir", "unido", y similar se usan intercambiabilmente en el presente documento con "sujetar", "sujeto", y similares.
- 45 Como se usa en el presente documento, una molécula o resto "unido" a un núcleo de una nanopartícula puede estar incorporado al núcleo, contenido en el núcleo, unido a una molécula que forma al menos una parte del núcleo, unido a una molécula unida al núcleo, o unido directamente al núcleo.
- 50 Como se usa en el presente documento, un "derivado" de un compuesto es un compuesto estructuralmente similar al compuesto del que es derivado. Muchos derivados son derivados funcionales. Es decir, los derivados generalmente una función similar deseada al compuesto del que es un derivado. A modo de ejemplo, trifenilfosfonio (TPP) se describe en el presente documento como resto director mitocondrial porque puede acumularse, o hacer que se acumule un compuesto o complejo (tal como una nanopartícula) al que está unido, en las mitocondrias. Por consiguiente, un derivado funcional de TPP es un derivado de TPP que puede acumularse, o hacer que se acumule un compuesto o complejo al que está unido, en las mitocondrias en una concentración similar a TPP (por ejemplo, en un intervalo de concentración aproximadamente 100 veces, tal como en un intervalo de concentración aproximadamente 10 veces).
- 60 Las nanopartículas, como se describe en el presente documento, incluyen, en realizaciones, un núcleo hidrófobo, una capa hidrófila que rodea al núcleo, y uno o más restos directores mitocondriales, así como uno o más agentes diagnósticos o uno o más agentes terapéuticos. En realizaciones, los agentes de contraste o agentes terapéuticos están contenidos o incorporados en el núcleo. Si la nanopartícula incluye agentes terapéuticos, los agentes se liberan preferentemente del núcleo a una velocidad deseada. En realizaciones, el núcleo es biodegradable y libera los agentes a medida que el núcleo se degrada o erosiona. Los restos directores se extienden preferentemente hacia fuera del núcleo de modo que estén disponibles para interacción con componentes celulares o de modo que afecten a propiedades superficiales de la nanopartícula, interacciones o propiedades superficiales que favorecerán
- 65

una distribución preferencial en las mitocondrias. Los restos directores pueden estar conectados al núcleo o a componentes que interactúan con el núcleo.

I. Núcleo

El núcleo de la nanopartícula puede formarse a partir de cualquier componente o componentes adecuados. Preferentemente, el núcleo se forma de componentes hidrófobos tales como polímeros hidrófobos o partes hidrófobas de polímeros. El núcleo puede incluir también o alternativamente copolímeros en bloque que tienen partes hidrófobas y partes hidrófilas que pueden autoensamblarse en un entorno acuoso en partículas que tienen el núcleo hidrófobo y una superficie exterior hidrófila. En realizaciones, el núcleo comprende uno o más polímeros biodegradables o un polímero que tiene una parte biodegradable.

Se puede usar cualquier polímero bioabsorbible natural o sintético adecuado. Tales polímeros son reconocibles e identificables por el experto habitual en la materia. Ejemplos no limitantes de polímeros biodegradables sintéticos incluyen: poli(amidas) tales como poli(aminoácidos) y poli(péptidos); poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico),

poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), y poli(caprolactona); poli(anhídridos); poli(ortoésteres); poli(carbonatos); y derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones hechas rutinariamente por los expertos en la materia), fibrina, fibrinógeno, celulosa, almidón, colágeno, y ácido hialurónico, copolímeros y mezclas de los mismos. Las propiedades y perfiles de liberación de estos y otros polímeros adecuados se conocen o se identifican fácilmente.

En diversas realizaciones, el núcleo descrito en el presente documento comprende PLGA. PLGA es un polímero biodegradable hidrófobo bien conocido y estudiado usado para el suministro y liberación de agentes terapéuticos a velocidades deseadas.

Preferentemente, los al menos alguno de los polímeros usados para formar el núcleo son anfífilos teniendo partes hidrófobas y partes hidrófilas. Las partes hidrófobas pueden formar el núcleo, mientras que la regiones hidrófilas pueden formar una capa y rodea al núcleo para ayudar a la nanopartícula a evadir el reconocimiento del sistema inmune y mejorar la semivida en circulación. Ejemplos de polímeros anfífilos incluyen copolímeros en bloque que tienen un bloque hidrófobo y un bloque hidrófilo. En realizaciones, el núcleo está formado por porciones hidrófobas de un copolímero en bloque, un polímero hidrófobo, o combinaciones de los mismos.

La proporción de polímero hidrófobo a polímero anfífilo puede variarse para variar el tamaño de la nanopartícula. En realizaciones, una mayor proporción de polímero hidrófobo a polímero anfífilo resulta en una nanopartícula que tiene un mayor diámetro. Se puede usar cualquier proporción de polímero hidrófobo a polímero anfífilo. En realizaciones, la nanopartícula incluye aproximadamente una proporción 50/50 en peso de polímero anfífilo a polímero hidrófobo o una proporción que incluye más polímero anfífilo que polímero hidrófilo, tal como aproximadamente proporción 20/80, aproximadamente una proporción 30/70, aproximadamente una proporción 40/60, aproximadamente una proporción 55/45, aproximadamente una proporción 60/40, aproximadamente una proporción 65/45, aproximadamente una proporción 70/30, aproximadamente una proporción 75/35, aproximadamente una proporción 80/20, aproximadamente una proporción 85/15, aproximadamente una proporción 90/10, aproximadamente una proporción 95/5, aproximadamente una proporción 99/1, o aproximadamente 100% de polímero anfífilo.

En realizaciones, el polímero hidrófobo comprende PLGA, tal como PLGA-COOH o PLGA-OH o PLGA-TPP. En realizaciones, el polímero anfífilo comprende PLGA y PEG, tal como PLGA-PEG. El polímero anfífilo puede ser un polímero dendrítico que tiene partes hidrófilas ramificadas. Los polímeros ramificados pueden permitir la unión de más de un resto en los extremos terminales de las colas poliméricas hidrófilas ramificadas, ya que los polímeros ramificados tienen más de un extremo terminal.

Como se describe en el presente documento, las nanopartículas que tienen un diámetro de aproximadamente 250 nm o menos; por ejemplo aproximadamente 200 nm o menos, se dirigen generalmente más eficazmente a las mitocondrias que nanopartículas que tienen un diámetro de más de aproximadamente 250 nm o más de aproximadamente 200 nm. De acuerdo con la invención, la nanopartícula tiene un diámetro de 70 a 330 nm. En realizaciones, una nanopartícula eficaz para dirección mitocondrial tiene un diámetro de aproximadamente 190 nm o menos, aproximadamente 180 nm o menos, aproximadamente 170 nm o menos, aproximadamente 160 nm o menos, aproximadamente 150 nm o menos, aproximadamente 140 nm o menos, aproximadamente 130 nm o menos, aproximadamente 120 nm o menos, aproximadamente 110 nm o menos, aproximadamente 100 nm o menos, aproximadamente 90 nm o menos, aproximadamente 80 nm o menos. En realizaciones, una nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm.

II. Capa hidrófila que rodea al núcleo

Las nanopartículas descritas en el presente documento incluyen una capa hidrófila que rodea al núcleo hidrófilo. La capa hidrófila puede ayudar a la nanopartícula a evadir el reconocimiento del sistema inmune y puede mejorar la semivida en circulación de la nanopartícula.

Tal como se ha indicado anteriormente, la capa hidrófila puede formarse, total o parcialmente, mediante una parte hidrófila de un polímero anfifílico, tal como un copolímero en bloque que tiene un bloque hidrófobo y un bloque hidrófilo.

Cualquier polímero hidrófilo adecuado o parte hidrófila de un polímero anfifílico puede formar la capa hidrófila o parte de la misma. El polímero hidrófilo o la parte hidrófila de un polímero puede ser un polímero lineal o ramificado o dendrítico. Ejemplos de polímeros hidrófilos adecuados incluyen polisacáridos, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, polietilenglicol, óxido de polimetileno, y similares.

En realizaciones, una parte hidrófila de un copolímero en bloque comprende polietilenglicol (PEG). De acuerdo con la invención, un copolímero en bloque comprende una parte hidrófoba que comprende PLGA y una parte hidrófila que comprende PEG.

Un polímero hidrófilo o parte hidrófila de un polímero puede contener restos que están cargados en condiciones fisiológicas, que se puede aproximar mediante una solución salina tamponada, tal como una solución salina tamponada con fosfato o citrato, a un pH de aproximadamente 7,4, o similar. Tales restos pueden contribuir a la densidad de carga o potencial zeta de la nanopartícula. El potencial zeta es un término para potencial electrocinético en sistemas coloidales. Aunque el potencial zeta no es directamente medible, puede determinarse experimentalmente usando movilidad electroforética, movilidad electroforética dinámica, o similar.

Como se indica en el presente documento, el potencial zeta desempeña un papel en la capacidad de las nanopartículas para acumularse en las mitocondrias, resultando potenciales zeta mayores generalmente en acumulación aumentada en las mitocondrias. De acuerdo con la invención, las nanopartículas tienen un potencial zeta, según se mide mediante dispersión de luz dinámica, de más de 0 mV. Por ejemplo, una nanopartícula puede tener un potencial zeta de aproximadamente 1 mV o mayor, de aproximadamente 5 mV o mayor, de aproximadamente 7 mV o mayor, o aproximadamente 10 mV o mayor, o aproximadamente 15 mV o mayor, de aproximadamente 20 mV o mayor, aproximadamente 25 mV o mayor, aproximadamente 30 mV o mayor, aproximadamente 34 mV o mayor, aproximadamente 35 mV o mayor, o similar. En realizaciones, una nanopartícula tiene un potencial zeta de aproximadamente 1 mV a 50 mV, de aproximadamente 2 mV a aproximadamente 40 mV, de aproximadamente 7 mV a aproximadamente 35 mV, o similar.

Cualquier resto adecuado que pueda cargarse en condiciones fisiológicas puede ser parte de o unirse a un polímero hidrófilo o parte hidrófila de un polímero. En realizaciones, el resto está presente en un extremo terminal del polímero o parte hidrófila del polímero. Por supuesto, el resto puede unirse directa o indirectamente a la cadena de polímero en una ubicación distinta al extremo terminal. Debido al potencial electroquímico básicamente negativo mantenido a través de la membrana mitocondrial interior, los cationes, particularmente si están deslocalizados, son eficaces para atravesar las membranas hidrófobas y acumularse en la matriz mitocondrial. Se discuten con más detalle posteriormente restos catiónicos que se conocen por facilitar la dirección mitocondrial. Sin embargo, pueden incluirse restos catiónicos que no son particularmente eficaces para dirección mitocondrial selectiva en nanopartículas o unirse a polímeros hidrófilos o partes de polímeros. En realizaciones, los restos aniónicos pueden formar parte de o unirse al polímero hidrófilo o parte de un polímero. Pueden incluirse restos aniónicos o polímeros que contienen los restos aniónicos en nanopartículas para ajustar el potencial zeta, según se desee. En realizaciones, un polímero hidrófilo o parte de un polímero incluye un grupo hidroxilo que puede resultar en un anión de oxígeno cuando se coloca en un ambiente acuoso fisiológico. En realizaciones, el polímero comprende PEG-OH donde el OH sirve como resto cargado en condiciones fisiológicas. De acuerdo con la invención, el polímero director es poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-b-poli(etilenglicol) catión trifenilfosfonio (PLGA-b-PEG-TPP).

III. Restos directores mitocondriales

Las nanopartículas descritas en el presente documento incluyen uno o más restos que dirigen las nanopartículas a las mitocondrias. Como se usa en el presente documento, "dirigir" una nanopartícula a las mitocondrias significa que la nanopartícula se acumula en las mitocondrias con respecto a otros orgánulos o el citoplasma a una concentración mayor que una nanopartícula no dirigida básicamente similar. Una nanopartícula no dirigida básicamente similar incluye los mismos componentes en básicamente la misma concentración relativa (por ejemplo, en aproximadamente un 5%) que la nanopartícula dirigida, pero carece de resto director.

Los restos directores mitocondriales pueden estar conectados al núcleo en cualquier forma adecuada, tal como unión a una molécula que forma parte del núcleo o a una molécula que está unida al núcleo. En realizaciones, un resto director está unido a un polímero hidrófilo que está unido a un polímero hidrófobo que forma parte del núcleo. En realizaciones, un resto director está unido a una parte hidrófila de un copolímero en bloque que tiene un bloque hidrófobo que forma parte del núcleo.

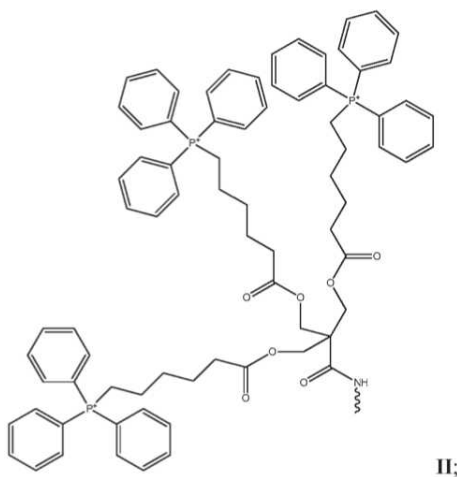
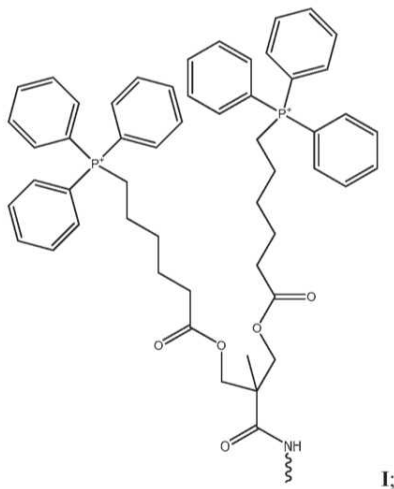
Los restos directores pueden unirse a cualquier parte adecuada de un polímero. En realizaciones, los restos directores se unen a un extremo terminal de un polímero. En realizaciones, los restos directores se unen a la cadena del polímero, o a una molécula unida a la cadena, en una ubicación distinta al extremo terminal del polímero. Puede unirse más de un resto director a un polímero dado. En realizaciones, el polímero es un polímero dendrítico que tiene múltiples extremos terminales y los restos directores pueden unirse a más de un extremo terminal.

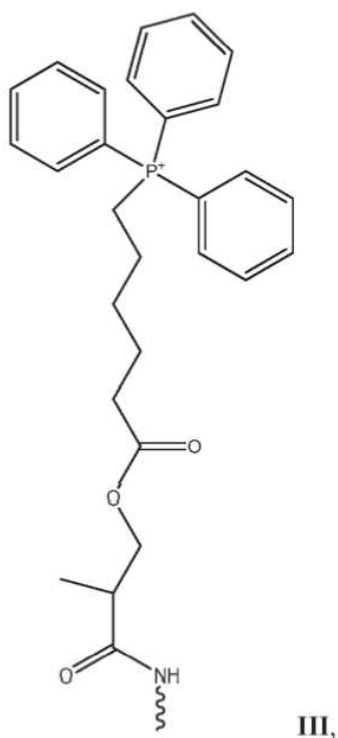
Los polímeros, o partes de los mismos, a los que se unen los restos directores pueden contener, o modificarse para contener, grupos funcionales apropiados, tales como -OH, -COOH, -NH₂, -SH, -N₃, -Br, -Cl, -I, -CH=CH₂, C≡CH, -CHO o similar, para reacción con y unión a los restos directores que tienen, o se modifican para tener, grupos funcionales adecuados.

Se presentan ejemplos de restos directores conectados a polímeros en la presente divulgación para ilustrar los tipos de reacciones y conexiones que se pueden producir. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que la conexión de restos directores a polímeros puede realizarse según cualquiera de un número de procesos de reacción químicos conocidos.

Los restos directores pueden estar presentes en las nanopartículas a cualquier concentración adecuada. En realizaciones, la concentración puede variarse fácilmente basándose en análisis iniciales *in vitro* para optimizar antes de estudio o uso *in vivo*. En realizaciones, los restos directores tendrán cubrimiento superficial de aproximadamente 5% a aproximadamente 100%.

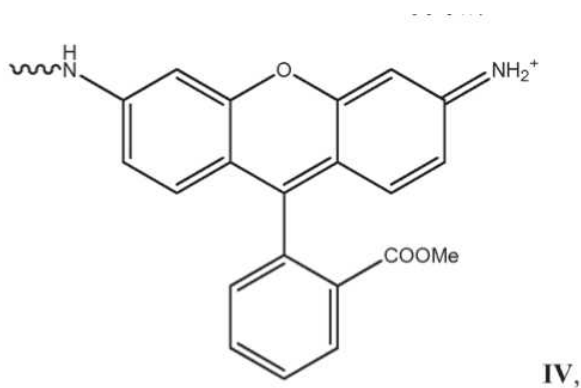
Se puede emplear cualquier resto adecuado para facilitar la acumulación de nanopartículas en las mitocondrias. Debido al potencial electroquímico básicamente negativo mantenido a través de la membrana mitocondrial interior, los cationes lipófilos deslocalizados son eficaces para cruzar las membranas hidrófobas y acumularse en las mitocondrias. Los compuestos de trifenilfosonio (TPP) pueden acumularse más de 10 veces en la matriz mitocondrial. De acuerdo con la invención, el resto director mitocondrial es TPP. Puede usarse cualquier compuesto adecuado que contenga TPP como resto director a matriz mitocondrial. Los ejemplos representativos de restos basados en TPP pueden tener estructuras indicadas posteriormente en la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III:





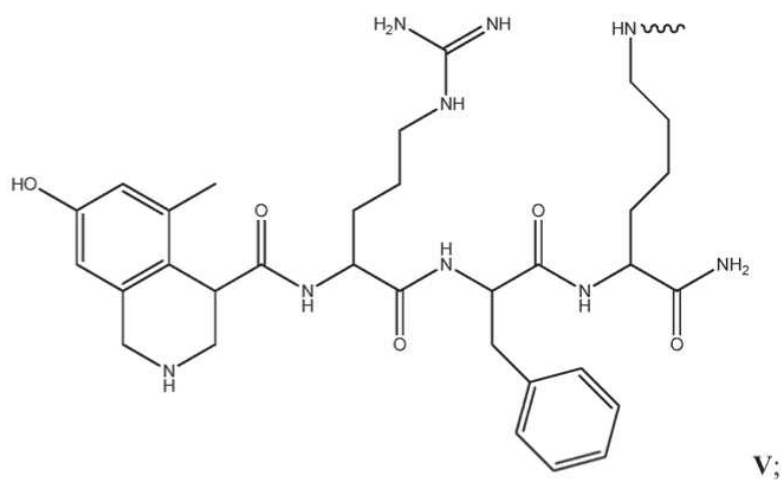
donde la amina (como se representa) puede conjugarse a un polímero u otro componente para incorporación a la nanopartícula.

En un aspecto de la divulgación, el catión lipófilo deslocalizado para dirigir a la matriz mitocondrial es un catión rodamina, tal como Rodamina 123 que tiene Fórmula IV como se representa posteriormente (no se reivindica):

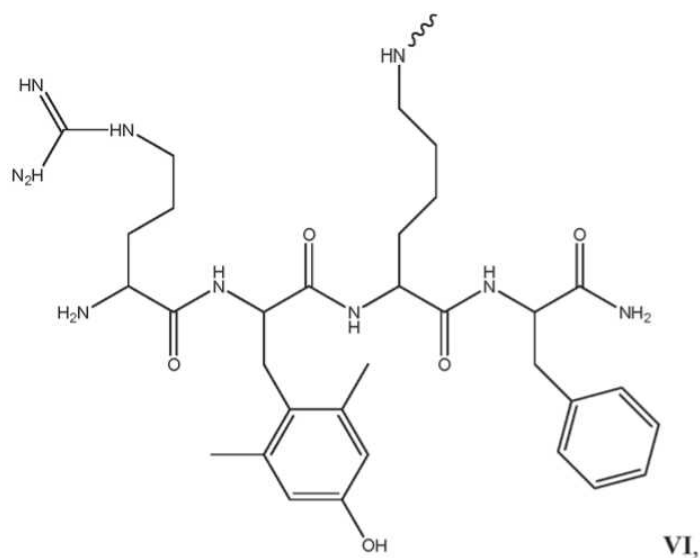


donde la amina secundaria (como se representa) puede conjugarse a un polímero, lípido, o similar para incorporación a la nanopartícula.

Por supuesto, los compuestos no catiónicos pueden servir para dirigir y acumularse en la matriz mitocondrial. A modo de ejemplo, el péptido Szeto-Shiller puede servir para dirigir y acumular una nanopartícula en la matriz mitocondrial. Puede emplearse cualquier péptido Szeto-Shiller adecuado como resto director a matriz mitocondrial. Los ejemplos no limitantes de péptidos Szeto-Shiller adecuados incluyen SS-02 y SS-31, que tienen Fórmula V y Fórmula VI, respectivamente, como se representa posteriormente (no se reivindica):



o

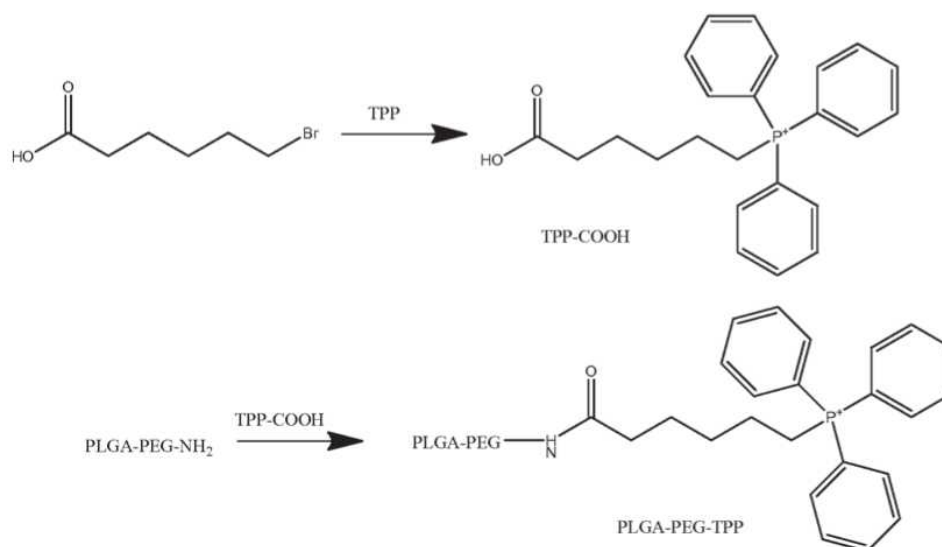


5

donde la amina secundaria (como se representa) puede conjugarse a un polímero, lípido, o similar para incorporación a la nanopartícula.

10 Con fines de ejemplo, se muestra posteriormente un esquema de reacción para la síntesis de PLGA-PEG-TPP (el resto director mitocondrial según las reivindicaciones) en el Esquema I. Se entenderá que pueden emplearse otros esquemas para sintetizar PLGA-PEG-TPP y que pueden emplearse esquemas de reacción similares para conectar otros restos directores mitocondriales a PLGA-PEG o conectar restos a otro polímero o componentes de una nanopartícula.

15



(Esquema I)

Preferentemente, un resto director está unido a un polímero hidrófilo o parte hidrófila de un polímero para que el resto director se extienda desde el núcleo de la nanopartícula para facilitar el efecto del resto director.

Se entenderá que el resto director mitocondrial puede alterar el potencial zeta de una nanopartícula. Por consiguiente, el potencial zeta de una nanopartícula puede afinarse ajustando la cantidad de resto director incluida en la nanopartícula. El potencial zeta también puede ajustarse incluyendo otros restos cargados, tales como restos cargados de, o unidos a, polímeros hidrófilos o partes hidrófilas de polímeros.

En aspectos de la divulgación, se proporcionan restos cargados solo por, o básicamente por, restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 95% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 90% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 85% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 80% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 75% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 70% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 65% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 60% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 55% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. En realizaciones, aproximadamente un 5% o más de los restos cargados se proporcionan por restos directores mitocondriales. Por supuesto, los restos directores mitocondriales pueden proporcionar cualquier cantidad o porcentaje adecuado de restos cargados.

En realizaciones, las nanopartículas se forma mezclando un polímero que incluye un resto director mitocondrial con un polímero que incluye un resto cargado distinto de un resto director mitocondrial.

IV. Agentes terapéuticos

Una nanopartícula, como se describe en el presente documento, pueden incluir uno cualquiera o más agentes terapéuticos. El agente terapéutico puede estar incorporado, o contenido en, el núcleo de la nanopartícula. Preferentemente, el agente terapéutico se libera del núcleo a velocidad deseada. Si el núcleo está formado partir de un polímero (tal como PLGA) o combinación de polímeros que tienen velocidades de liberación conocidas, la velocidad de liberación puede controlarse fácilmente.

En realizaciones, un agente terapéutico o precursor del mismo está conjugado a un polímero, u otro componente de una nanopartícula, de una forma descrita anteriormente con respecto a los restos directores. El agente terapéutico puede conjugarse mediante un conector escindible de modo que el agente pueda liberarse cuando la nanopartícula alcance la ubicación diana, tal como las mitocondrias.

Los agentes terapéuticos pueden estar presentes en la nanopartícula en cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, un agente terapéutico puede estar presente en la nanopartícula en una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 30% en peso de la nanopartícula.

En realizaciones, la nanopartícula incluye uno o más agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad asociada a disfunción mitocondrial. Tales enfermedades incluyen enfermedad neurodegenerativa, obesidad, y cáncer.

- 5 Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas que pueden estar asociadas a disfunción mitocondrial incluyen enfermedad de Alzheimer, lesión isquémica, enfermedad de Parkinson y apoplejía. Ejemplos de tipos de cáncer que pueden estar asociados a disfunción mitocondrial incluyen cánceres de mama, próstata, colon, melanoma y linfoma.

- 10 En realizaciones, la nanopartícula incluye uno o más agentes terapéuticos configurados para reducir cantidades de amiloide beta. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser curcumina, otros antioxidantes, ácido fólico o lacmoide.

En realizaciones, la nanopartícula incluye uno o más desacopladores mitocondriales que actúan para separar la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser 2,4-dinitrofenol (DNP).

- 15 En realizaciones, la nanopartícula incluye uno o más agentes anticancerígenos de acción mitocondrial. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser (i) un modulador de la familia de proteínas BCL-3, tal como compuestos que actúan sobre BCL-X_L, BCL-2, BCL-W, MCL1, o similares; (ii) inhibidores metabólicos tales como compuestos que afectan a, HK, afectan a la interacción HK2-VDAC, inhibidores de PDK, afectan a LDH-A, afectan a ácido graso sintasa, afectan a ATP citrato liasa, inhibidores de acetil-CoA carboxilasa, o similares; (iii) agentes directores a VDAC o directores a ANT; (iv) reguladores de ROS tales como inhibidores de SOD, inhibidores de GSH, inhibidores de GPX, o similares; (v) inhibidor de HSP90; o (vi) similar. Ejemplos de agentes anticancerígenos de acción mitocondrial
20 específicos incluyen lonidamina (LND), succinato de α -tocoferilo (α -TOS), dicloroacetato, A-385358, ABT-263, ABT-737, AT-101, 2-amino-6-bromo-4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-4H-cromeno-3-carboxilato (HA14-1), oblimersen, obatoclast, gopipol, jasmonato de metilo, dicloroacetato, péptido HK2, ARNsh LDH-A, orlistat, SB-204990, sorafeno A, 4-(N-(s-glutationilacetato)aminofenilarsenóxido (GSAO), clodronato, PK11195, menadiona, β -lapachona, CD437, gamitrinibs, 8-(2-cloro-3,4,5-trimetoxibencil)-2-fluoro-9-(pent-4-ynil)-9H-purin-6-amina (PU24FcI), (8-(6-bromobenzo[d][1,3]dioxol-5-iltio)-9-(pent-4-inil)-9H-purin-6-amina (PU-H58), 8-(6-yodobenzo[d][1,3]dioxol-5-iltio)-9-(3-isopropilamio)propil-9H-purin-6-amina (PU-H71), seferdina, reservatrol, 2-metoxiestradiol, tetratiomolibdato (ATN-224), butionina sulfoximina, dimetilamino-partenolida (DMAPT), partenolida, imexonas, mangafodipir, menadiona, motexafino gadolinio, PEITC, elescomol (STA-4783), ácido todo-trans retinoico, ácido 6-[3-(1-adamantil)-4-hidroxifenil]-2-naftalenocarboxílico (CD437), ácido (E)-3-(4'-hidroxi-3'-adamantilbifenil-4il)acrílico (ST1926), 3-bromopiruvato, ácido butírico, resveratrol, 2-desoxi-D-glucosa, arsenito trióxido, ácido betulínico, y similares. Uno o más compuestos o clases descompuestos descritos en, por ejemplo, Fulda et al., targeting mitochondria for cancer therapy, Nature Reviews-Drug Discovery, volumen 9: 447 (junio de 2010), pueden usarse.

35 V. Agentes de contraste

- Una nanopartícula como se describe en el presente documento puede incluir uno o más agentes de contraste para formación de imágenes, visualización o diagnóstico. En realizaciones, la formación de imágenes se realiza para
40 verificar que las nanopartículas terapéuticas se transportan adecuadamente a la mitocondria. Puede emplearse cualquier agente de contraste adecuado. En realizaciones, el agente de contraste es adecuado para formación de imágenes por resonancia magnética *in vivo* (MRI), tal como nanocristales de óxido de hierro (IO) o complejos de gadolinio. En realizaciones, el agente de contraste es adecuado para formación de imágenes ópticas *ex vivo/in vivo*, tal como punto cuántico (QD) (fluorescencia) o colorantes fluorescentes, puntos c, puntos p, o similar. En
45 realizaciones, la nanopartícula incluye tanto agentes de contraste para MRI como agentes para formación de imágenes ópticas fluorescentes. De acuerdo con la invención, la nanopartícula puede comprender un punto cuántico.

- Pueden incorporarse agentes de contraste a la nanopartícula de cualquier forma adecuada. En realizaciones, los agentes de contraste se incorporan al núcleo o están contenidos en el núcleo. En realizaciones, los agentes de
50 contraste se conectan a un polímero u otro componente de la nanopartícula. Tal conexión puede realizarse como se describió anteriormente con respecto a otros componentes de la nanopartícula, tales como restos directores.

- Pueden estar presentes agentes de contraste en una nanopartícula en cualquier cantidad adecuada. En realizaciones, un agente de contraste está presente en una nanopartícula de aproximadamente 0,05% en peso a
55 aproximadamente 30% en peso de la nanopartícula.

VI. Síntesis de nanopartículas

- Las nanopartículas, como se describe en el presente documento, pueden sintetizarse o ensamblarse mediante
60 procesos adecuados. Preferentemente, las nanopartículas se ensamblan en una etapa individual para minimizar variación de proceso. Un proceso de tapa individual puede comprender nanoprecipitación y autoensamblaje.

- En general, las nanopartículas pueden sintetizarse o ensamblarse disolviendo o suspendiendo componentes hidrófobos en un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente que es miscible en un disolvente acuoso usado
65 para precipitación. En realizaciones, se usa acetonitrilo como disolvente orgánico, pero cualquier disolvente adecuado tal como dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetona, o similar, puede usarse. Se

disuelven componentes hidrófilos en un disolvente acuoso adecuado, tal como agua, etanol al 4%, o similar. La solución de fase orgánica puede añadirse gota a gota a la solución de fase acuosa para nanoprecipitar los componentes hidrófobos y permitir el autoensamblaje de la nanopartícula en el disolvente acuoso.

Un proceso para determinar las condiciones apropiadas para formar las nanopartículas puede ser el siguiente. En resumen, polímeros funcionalizados y otros componentes, si se incluyen o son apropiados, pueden codisolverse en mezclas de disolventes orgánicos. Esta solución puede añadirse gota a gota en disolvente acuoso caliente (por ejemplo, 65 °C) (por ejemplo, agua, etanol al 4%, etc.), tras lo cual se evaporarán los disolventes, produciendo nanopartículas con un núcleo hidrófobo rodeado por un componente polimérico hidrófilo, tal como PEG. Una vez se ha conseguido un conjunto de condiciones donde un alto nivel (por ejemplo, >75%) de carga superficial de resto director, pueden incluirse agentes de contraste o agentes terapéuticos en la nanoprecipitación y autoensamblaje de las nanopartículas.

Si los resultados no son deseablemente reproducibles por mezcla manual, se pueden usar canales microfluidos.

Las nanopartículas pueden caracterizarse por su tamaño, carga, estabilidad, carga IO y QD, carga de fármaco, cinética de liberación de fármaco, morfología superficial, y estabilidad usando métodos bien conocidos o publicados.

Las propiedades de nanopartícula pueden controlarse (a) controlando la composición de la solución de polímero, y (b) controlando las condiciones de mezcla tales como tiempo de mezcla, temperatura, y proporción de agua a disolvente orgánico. La probabilidad de variación en las propiedades de nanopartícula aumenta con el número de etapas de procesamiento requeridas para la síntesis.

El tamaño de la nanopartícula producida puede variarse alterando la proporción de componentes nucleares hidrófobos a componentes capsulares anfífilos. El tamaño de nanopartícula también puede controlarse cambiando la longitud de polímero, cambiando el tiempo de mezcla, y ajustando la proporción de compuesto orgánico en la fase. La experiencia anterior con nanopartículas de PLGA-*b*-PEG de diferentes longitudes sugiere que el tamaño de nanopartícula aumentará de un mínimo de aproximadamente 20 nm para polímeros cortos (por ejemplo, PLGA₃₀₀₀-PEG₇₅₀) a un máximo de aproximadamente 150 nm para polímeros largos (por ejemplo, PLGA_{100.000}-PEG_{10.000}). Así, el peso molecular del polímero servirá para ajustar el tamaño.

La carga superficial de nanopartícula puede controlarse mezclando polímeros con grupos terminales cargados apropiadamente. Además, la composición y química superficial pueden controlarse mezclando polímeros con longitudes de polímero hidrófilo diferentes, polímeros hidrófilos ramificados, o añadiendo polímeros hidrófobos.

Una vez formadas, las nanopartículas pueden recogerse y lavarse por centrifugación, ultrafiltración centrífuga, o similar. Si se produce agregación, las nanopartículas pueden purificarse por diálisis, pueden purificarse por centrifugación más prolongada a velocidades inferiores, pueden purificarse con el uso de tensioactivo, o similar.

Una vez recogidas, cualquier cantidad de disolvente remanente puede retirarse y las partículas pueden secarse, que ayudaría a minimizar cualquier descomposición prematura o liberación de componentes. Las nanopartículas pueden liofilizarse con el uso de agentes de masa tales como manitol, o prepararse de otro modo para almacenamiento antes de uso.

Se entenderá que los agentes terapéuticos pueden situarse en la fase orgánica o la fase acuosa según su solubilidad.

Las nanopartículas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier otro componente adecuado, tales como componentes de fosfolípidos o colesterol, generalmente conocidos o entendidos en la técnica como adecuados para inclusión en nanopartículas. La solicitud de patente pendiente de publicación, PCT/US2012/053307, describe un número de componentes adicionales que pueden incluirse en nanopartículas.

Las nanopartículas desveladas en PCT/US2012/053307 incluyen restos directores que dirigen las nanopartículas a células apoptóticas, tales como restos que dirigen a fosfatidilserina (PS). Los restos directores están conjugados a un componente de la nanopartícula. Tales restos incluyen diversos polipéptidos o complejos de coordinación cinc 2,2'-dipicolilamina (Zn²⁺-DPA). En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a células apoptóticas. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a células apoptóticas que están conjugados a un componente de la nanopartícula. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a PS. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a PS que están conjugados a un componente de la nanopartícula. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a PS-polipéptido o restos Zn²⁺-DPA. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a PS-polipéptido o restos Zn²⁺-DPA que están conjugados a un componente de la nanopartícula.

Las nanopartículas desveladas en PCT/US2012/053307 incluyen restos directores a macrófagos, tales como azúcares sencillos, conjugados a componentes de las nanopartículas. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a macrófagos. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos directores a macrófagos que están conjugados a la nanopartícula o un componente de la misma. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos de azúcar sencillo. En realizaciones, las nanopartículas descritas en el presente documento están exentas o básicamente exentas de restos de azúcar sencillo que están conjugados a la nanopartícula o un componente de la misma.

VII. Uso y ensayo

En general, una nanopartícula como se describe en el presente documento puede dirigirse a mitocondrias, específicamente a las mitocondrias. Las nanopartículas pueden usarse para visualización, formación de imágenes, monitorización, diagnóstico, o tratamiento de enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial.

El rendimiento y características de las nanopartículas producidas en el presente documento pueden ensayarse o estudiarse de cualquier forma adecuada. A modo de ejemplo, la eficacia terapéutica puede evaluarse usando ensayos basados en células. Toxicidad, biodistribución, farmacocinética, y estudios de eficacia pueden ensayarse en células o roedores u otros mamíferos. Pueden emplearse el pez cebra u otros modelos animales para estudios combinados de formación de imágenes y terapia. Roedores, conejos, cerdos, o similares pueden usarse para evaluar el potencial diagnóstico o terapéutico de nanopartículas. Algunos detalles adicionales de estudios que pueden realizarse para evaluar el rendimiento o características de las nanopartículas, que pueden usarse para optimizar las propiedades las nanopartículas, se describen posteriormente. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que pueden realizarse fácilmente otros ensayos y procedimientos.

Las características de captación y unión de nanopartículas que encapsulan QD fluorescente pueden evaluarse en cualquier línea celular adecuada, tal como RAW 264.7, J774, jurkat, y células HUVEC. El papel inmunomodulador de las nanopartículas puede ensayarse determinando la liberación de citoquinas cuando estas células se exponen a condiciones variables de nanopartículas. Puede estudiarse activación de complemento para identificar qué rutas se desencadenan usando columnas para aislar nanopartículas opsonizadas; por ejemplo como se describe en Salvador-Morales C, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC, Immunocompatibility properties of lipid-polymer hybrid nanoparticles with heterogeneous surface functional groups, Biomaterials 30: 2231-2240, (2009). Pueden realizarse mediciones de fluorescencia usando un lector de placa, FACS, o similar. Debido a que el tamaño de nanopartícula es un factor importante que determina la biodistribución, las nanopartícula se pueden emparejar en diversos tamaños (por ejemplo, 20-40, 40-60, 60-80, 80-100, 100-150, y 150-300 nm) y ensayar de acuerdo con el tamaño.

Puede usarse cualquier tipo celular apropiado para un agente terapéutico empleado en una nanopartícula para evaluar la eficacia terapéutica o dirección apropiada. Pueden emplearse ensayos apropiados para resultado terapéutico farmacológico, como se entiende conoce generalmente en la técnica.

Pueden realizarse estudios de biodistribución (bioD) y farmacocinética (PK) en ratas u otros mamíferos adecuados. Para análisis de PK y bioD, se pueden dosificar ratas Sprague Dawley con nanopartículas dirigidas a macrófagos, dirigidas a apoptosis, etiquetadas con QD, o nanopartículas similares sin grupos directores, a través de una inyección en vena de cola lateral. La bioD puede seguirse inicialmente por formación de imágenes de fluorescencia durante 1-24 h después de inyección. Los animales pueden sacrificarse; y cerebro, corazón, intestino, hígado, bazo, riñón, músculo, hueso, pulmón, ganglios linfáticos, intestino, y piel pueden extirparse, pesarse, homogeneizarse, y puede cuantificarse Cd de QD usando ICP-MS. La concentración tisular puede expresarse como % de dosis inyectada por gramo de tejido (%ID/g). La semivida en sangre puede calcularse a partir de las concentraciones sanguíneas de Cd en diversos puntos temporales

Las dosificaciones terapéuticas de nanopartículas eficaces para uso humano pueden estimarse de estudios animales según técnicas bien conocidas, tal como escalado basado en área superficial o peso.

A continuación, se presentan ejemplos, que describen diversas realizaciones de nanopartículas representativas, métodos para producir las nanopartículas, y usos de las nanopartículas.

Ejemplos

MÉTODOS

A. Síntesis de PLGA-b-PEG-TPP

Síntesis de PLGA-b-PEG-TPP. HO-PEG-OH (0,75 g; 0,23 mmol), PLGA-COOH (0,50 g; 0,1 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,01 g; 0,08 mmol) se disolvieron en 7 ml de CH₂Cl₂ seco. Una solución de 2 ml de CH₂Cl₂ de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,02 g; 0,1 mmol) se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a 0 °C con

agitación. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La dicitclohexilurea insoluble se filtró, y la mezcla se precipitó en 50 ml de éter dietílico y metanol 50:50. El sólido resultante se centrifugó a 1.400 x g durante 15 min a 4 °C. Como purificación final, se precipitó repetidamente una solución metanólica de PLGA-b-PEG-OH, se lavó con éter dietílico frío, y se aisló en forma de un sólido blanco en un 30% (0,2 g) de rendimiento. RMN ¹H (CHCl₃-d): δ 5,3 [m, (OCHCH₃C(O))], 4,9 [m, (OCH₂C(O))], 3,6 [s, (OCH₂)], 1,9 [m, (CH₃CH)]. RMN ¹³C (CHCl₃-d): δ 169,6, 166,5, 66,0, 61,1, 60,9, 16,89, 15,46. Cromatografía de permeación en gel: M_n = 6.900 g/mol, M_w = 9.200 g/mol, M_z = 12.300 g/mol, PDI = 1,33. PLGA-b-PEG-OH (0,29 g; 0,03 mmol). Catión (5-carboxipentil)trifenilfosonio (31) (0,11 g; 0,29 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0,007 g; 0,06 mmol) se disolvieron en 3 ml de CH₂Cl₂ seco. DCC (0,06 g; 0,29 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (1 ml) y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción a 0 °C con agitación. La mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, después de lo cual la dicitclohexilurea formada se retiró por filtración. Después se añadieron 50 ml de éter dietílico frío a la mezcla resultante para precipitar el polímero. El sólido se centrifugó a 1.400 x g durante 15 min a 4 °C. El disolvente se retiró, y el sólido se liofilizó. El polímero se aisló en forma de un sólido blanco en un 99% (0,3 g) de rendimiento. RMN ¹H (CHCl₃-d): δ 7,9-7,6 [m, 15H (Ar)], 5,3 [m, (OCHCH₃C(O))], 4,9 [m, (OCH₂C(O))], 3,6 [s, (OCH₂)], 1,9 [m, (CH₃CH)]. RMN ¹³C (CHCl₃-d): δ 166,5, 135,3, 133,9, 130,7, 66,0, 61,0. 16,89, 15,46. IR: ν cm⁻¹ 3.029 (C-H sp²), 2.944 (C-H sp³), 2.200-2.000 (C-H Ar), 1.741 (C = O). RMN ³¹P (CHCl₃-d): δ 24,37.

B. Síntesis de PLGA-b-PEG-QD

PLGA-COOH (0,4 g; 80 μmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (12,4 mg; 80 μmol), y NHS (9 mg; 80 μmol) se disolvieron en 3 ml de dimetilformamida (DMF), y se añadió una solución de 250 μl de QD-PEG-NH₂ 8 μM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtró a través de a filtro de corte de 100 kDa Amicon (Millipore). El sólido resultante se disolvió en H₂O, se liofilizó durante una noche, y después se resuspendió en DMF. PLGA-b-PEG-QD se caracterizaron usando dispersión de luz dinámica (DLS), que dio un diámetro hidrodinámico de 10,1 ± 0,1 nm y un PDI de 0,3.

C. Síntesis de nanopartículas dirigidas y no dirigidas

Se sintetizaron nanopartículas por el método de nanoprecipitación como se describe generalmente en Marrache y Dhar (2012), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 16288-16293, Kolishetti et ál. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:17939-17944; y Dhar et ál. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108:1850-1855. En resumen, se añadió gota a gota PLGA-b-PEG-OH o PLGA-b-PEG-TPP en acetonitrilo a una concentración polimérica final de 5 mg/ml a agua nanopura con agitación constante. Después las nanopartículas se agitaron durante 2 h. El disolvente orgánico se retiró mediante tres lavados y filtración a través de un filtro de corte de 100 kDa Amicon (Millipore). Las nanopartículas se resuspendieron en agua nanopura y se almacenaron a 4 °C hasta uso adicional. Se realizaron mediciones DLS para determinar el tamaño de nanopartícula, PDI, y potencial zeta. Se sintetizaron nanopartículas PLGA-b-PEG-TPP con tamaños afinables mezclando proporciones predefinidas de PLGA-COOH (0, 10%, 20%, 35%, 50%, 70%, y 90%) con PLGA-b-PEG-TPP siguiendo el método de nanoprecipitación. Se variaron las cargas superficiales de nanopartículas PLGA-b-PEG-TPP mezclando proporciones predefinidas de PLGA-b-PEG-TPP (0, 15%, 35%, 50%, 65%, 80%, 90%, y 100%) con PLGA-b-PEG-OH siguiendo el método de nanoprecipitación mencionado anteriormente. Se sintetizaron nanopartículas mezcladas QD siguiendo este método de nanoprecipitación usando PLGA-b-PEG-OH o PLGA-b-PEG-TPP en DMF:acetonitrilo (proporción 1:9) con PLGA-b-PEG-QD (solución 10 mmol en DMF) hasta una concentración polimérica final de 5 mg/ml. Se realizaron mediciones DLS para determinar tamaño, PDI, y potencial zeta. Todas las nanopartículas se caracterizaron usando TEM. Para la síntesis de nanopartículas cargadas con compuestos terapéuticos, se mezcló PLGA-b-PEG-OH o PLGA-b-PEG-TPP (50 mg/ ml en DMF) con una cantidad predefinida de compuestos terapéuticos (10 mg/ml en DMF) y se diluyó con acetonitrilo hasta una concentración polimérica final de 5 mg/ml. Esta mezcla se añadió gota a gota a agua nanopura con agitación constante siguiendo el método de nanoprecipitación. Se realizaron mediciones DLS para determinar tamaño, PDI, y potencial zeta. Se determinaron carga de fármaco y eficacia de encapsulación disolviendo el núcleo polimérico y usando HPLC para cuantificar la cantidad de compuestos terapéuticos en las nanopartículas.

D. Cuantificación de nanopartículas en los compartimentos intracelulares

Se internalizaron nanopartículas mezcladas QD (10 μM) de tamaños y potenciales zeta variables en células HeLa (1,5 x 10⁷ células) durante 12 h. Después de internalización, las mitocondrias y el citosol se aislaron usando un kit de aislamiento de mitocondrias para células mamíferas. Después se analizaron las fracciones citosólica y mitocondrial para concentración de Cd en el QD por ICP-MS. Se realizó un ensayo de ácido bicinonínico (BCA) en las fracciones mitocondrial y citosólica aisladas para calcular la cantidad de Cd por microgramo de proteína aislado.

E. Ensayo de adipogénesis

Para inducir adipogénesis, se sembraron preadipocitos 3T3-L1 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5000 células por pocillo y crecieron hasta confluencia. Se evaluaron las propiedades antiadipogénesis de nanopartículas dirigidas y no dirigidas cargadas con 2,4-DNP y 2,4-DNP libre por internalización de nanopartículas en el día 1 del ensayo de adipogénesis. También en el día 1, las células se indujeron a diferenciarse en un medio de diferenciación DMEM que contenía 10% de FBS complementado con 0,5 mmol de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), dexametasona

0,5 μ M, e insulina 20 nM. En el día 3, el medio de inducción se reemplazó con medio de insulina que contenía DMEM, 10% de FBS, e insulina 20 nM. Después de 6 d de tratamiento, las células se analizaron para acumulación de triglicéridos usando el ensayo AdipoRed (Lonza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 F. Análisis de biodistribución y farmacocinética

Se administraron a ratas Sprague Dawley nanopartículas PLGA-*b*-PEG-TPP-QD intravenosamente. Se determinaron variación de niveles de Cd en plasma con el tiempo, distribución de órganos, y propiedades de excreción. Las ratas de control se inyectaron con salino.

10 G. Estadísticas

Todos los datos se expresan como la media $\pm$ SD. Las diferencias entre fármacos dirigidos, no dirigidos, y libres se evaluaron mediante ANOVA de una vía. $P < 0,05$ se consideró que indicó significación estadística.

15 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Desarrollo de nanopartículas mezcladas dirigidas

20 Los avances en la comprensión de la importancia de tamaño, forma, y carga superficial de nanopartículas basadas en PLGA para captación mitocondrial tienen el potencial de crear oportunidades para el desarrollo de vehículos de suministro dirigidos para enfermedades relacionadas con disfunción mitocondrial. Nosotros mezclamos un polímero funcionalizado de dirección mitocondrial, PLGA-*b*-PEG-TPP, con PLGA-COOH o con PLGA-*b*-PEG-OH para variar el tamaño y carga superficial de las nanopartícula resultantes, para estudiar el efecto de estas propiedades en la captación mitocondrial y determinar una formulación óptima. La probabilidad de variación en las propiedades de nanopartícula aumenta con el número de etapas de procesamiento requeridas para la síntesis. Nosotros anticipamos que incorporar el resto director TPP en el polímero antes de la síntesis de nanopartícula minimizaría tal variabilidad. Para suministrar compuestos terapéuticos en la mitocondria con alta eficacia, nosotros sintetizamos un polímero biodegradable con un grupo terminal OH (PLGA-*b*-PEG-OH) para permitir la conjugación de TPP para obtener PLGA-*b*-PEG-TPP (Figura 1). La conjugación del ligando director afectó a las propiedades claves de las nanopartículas, incluyendo potencial zeta, tamaño, captación celular, y transporte intracelular. Nosotros sintetizamos las nanopartículas mezcladas usando un método de nanoprecipitación como se describió anteriormente (Figura 2), y obtuvimos nanopartículas mezcladas dirigidas y no dirigidas con diámetro y cargas superficiales reproducibles en más de tres experimentos de nanoprecipitación independientes.

35 B. Afinado de tamaño y carga para captación mitocondrial

Nosotros realizamos un estudio representativo y exhaustivo para abordar el efecto de tamaño y carga superficial en la captación mitocondrial. Nosotros sentimos que era importante fabricar nanopartículas de diferentes tamaños y cargas superficiales pero con otras propiedades idénticas o básicamente idénticas. Nosotros mezclamos cantidades variables de PLGA-COOH con PLGA-*b*-PEG-TPP para construir una biblioteca de nanopartículas con tamaño variable y cargas superficiales constantes. Usando la tecnología de mezcla, nosotros pudimos afinar tamaños de nanopartícula de ~80 a ~410 nm (Figura 3) mientras se mantenía constante el número de restos TPP, que se evidencia por la carga superficial constante (Figura 3). Para explorar el efecto de la carga superficial en la captación mitocondrial, mezclamos cantidades predefinidas de PLGA-*b*-PEG-OH con PLGA-*b*-PEG-TPP. La carga superficial se alteró con éxito sin cambiar andamio principal y tamaño de nanopartícula (Figura 4). Estas bibliotecas de nanopartículas exhibieron poblaciones homogéneas de forma similar (imágenes TEM; Figuras 5A-F), permitiéndonos explorar los efectos de tamaño y carga de nanopartícula en la captación mitocondrial.

50 C. Propiedades directoras a mitocondrias

El perfil de captación celular de un sistema de nanopartículas refleja la eficacia y biodisponibilidad del sistema. Junto con una evaluación cuantitativa de captación celular, la ubicación subcelular es importante para evaluar la eficacia de la plataforma de nanopartículas actual. Nosotros usamos un punto cuántico (QD) informador fluorescente robusto para investigar la distribución de las nanopartículas dirigidas y no dirigidas en células HeLa de cáncer cervical humano. Nosotros usamos PEG terminado en amina conjugado con QD, NH₂-PEG-QD, para rastrear las nanopartículas en los compartimentos intracelulares. PLGA-COOH se conjugó a NH₂-PEG-QD para producir un copolímero en tribloque, PLGA-*b*-PEG-QD (Figura 1). Nosotros monitorizamos la internalización de las nanopartículas dirigidas y no dirigidas mezclando PLGA-*b*-PEG-QD con PLGA-*b*-PEG-TPP y con PLGA-*b*-PEG-OH, respectivamente. El análisis de microscopía confocal de las células tratadas indicó captación significativamente mayor de nanopartículas dirigidas que de nanopartículas no dirigidas en las mitocondrias de las células (FIGS. 7A-B). Una comparación de intensidades de fluorescencia indicó una captación global significativamente mayor de las nanopartículas dirigidas cargadas positivamente comparado con nanopartículas no dirigidas. El análisis cuantitativo usando el complemento "buscador de colocalización" de ImageJ reveló colocalización significativa de nanopartículas dirigidas con MitoTracker Green (Invitrogen) en las mitocondrias de las células (coeficiente de correlación de Pearson, $\rho = 0,53$).

Con las nanopartículas no dirigidas, las señales rojas de las nanopartículas y la tinción mitocondrial difirieron en posición, que se demuestra mediante un valor inferior p ($p = 0,03$).

D. Propiedades de escape endosomal y lisosomal

La captación y transporte intracelular de nanopartículas ocurre en varias rutas competitivas. El uso de nanopartículas para dirigir a mitocondrias está limitado a menudo por el hecho de que las nanopartículas se recogen mediante la ruta endosomal, y que los endosomas sirven como barrera para el transporte mitocondrial. Nosotros realizamos un estudio de captación dependiente del tiempo usando un marcador endosomal temprano EEA-1 para investigar el carácter fusogénico necesario para escape endosomal eficaz de las nanopartículas dirigidas. Para las nanopartículas dirigidas, se observó colocalización con endosomas en la primera hora y decreció en 2 h. Con el tiempo, las nanopartículas dirigidas exhibieron escape endosomal completo y se localizaron en las mitocondrias de las células (Figuras 7A-B); sin embargo, se observó colocalización significativa con los endosomas prematuramente con las nanopartículas no dirigidas incluso después de 4 h. El escape endosomal altamente eficaz de las nanopartículas dirigidas puede atribuirse a la alta capacidad de tamponamiento de estas nanopartículas, que puede hacer que actúen como "esponjas de protones". La absorbancia de protones por tamponamiento de PEG cargado positivamente prevendría la acidificación de las vesículas endosomales, aumentando así el flujo interior mediado por ATPasa de protones y contraiones, que asimismo puede conducir a hinchamiento osmótico, ruptura de membrana endosomal, y fuga final de las nanopartículas al citosol, haciéndolas accesibles para captación mitocondrial.

Para apoyar además los descubrimientos de que nuestras nanopartículas tienen alta escapabilidad endosomal y que algunas de las nanopartículas dirigidas no se captan en el transporte a lisosomas, estudiamos la colocalización dependiente del tiempo de las nanopartículas con lisosomas (Figuras 8A-B). Para las nanopartículas dirigidas, la colocalización con lisosomas disminuyó con el tiempo, sugiriendo capacidad de escape lisosomal, mientras que las nanopartículas no dirigidas se distribuyeron en los lisosomas y el citoplasma.

E. Estabilidad y efecto inmunogénico de las nanopartículas

Diversas nanopartículas cargadas positivamente demostraron interacciones con proteínas séricas, causando agregación debido a la adsorción superficial de proteínas cargadas negativamente. Las proteínas séricas no tuvieron efecto en el tamaño e índice de polidispersidad (PDI) de nuestras nanopartículas dirigidas en incubación con 10% (vol/vol) de FBS en DMEM o 10% (vol/vol) de FBS en H₂O durante 7 d. Este descubrimiento se apoyó además en la observación de que los potenciales zeta de las nanopartículas dirigidas cambiaron solo mínimamente después de contacto con 10% de FBS en DMEM o H₂O durante 7 d, sin agregación visible de partículas. Estos descubrimientos sugieren que la excelente estabilidad de las nanopartículas dirigidas en suero las hace adecuadas para aplicación *in vivo*.

Esta plataforma de nanopartículas sometida a ingeniería puede usarse para transportar compuestos terapéuticos para aplicación *in vivo* si no desencadenan una respuesta inmune. Las células inmunes del torrente sanguíneo y los tejidos tienen la propensión de engullir y eliminar nanopartículas cargadas positivamente. Nosotros evaluamos la respuestas inmunes para nanopartículas de tamaño y carga variados en términos de producción de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en macrófagos RAW 264.7 por ELISA, con LPS usado como control. Las nanopartículas de carga variable no exhibieron una respuesta inmune pronunciada; sin embargo, las nanopartículas >200 nm de diámetro demostraron producción de TNF- α (Figuras 6A-B). Estos descubrimientos confirmaron que las nanopartículas de tamaño y carga adecuados no son inmunogénicas y se pueden usar en estudios sistémicos *in vivo*.

F. Cuantificación de nanopartículas dirigidas en compartimentos subcelulares

Para atravesar las membranas mitocondriales, las nanopartículas se transportan a través de la membrana exterior a través del poro importador general. Nosotros anticipamos que las estructuras complicadas de las crestas tubulares, vesiculares, y planas y sus ligeras conexiones con la membrana mitocondrial interna impondrían restricciones en la movilidad de nanopartículas y haría su difusión un proceso dependiente del tamaño muy complicado. El potencial de membrana interna ($\Delta\Psi_m$), que es negativo en el interior, desempeña una función principal en la importación ejerciendo un efecto electroforético en las especies cargadas positivamente. Las nanopartículas con una carga positiva elevada se esperó que se importaran con un $\Delta\Psi_m$ menor que las nanopartículas con una carga positiva menor; así, usando una línea celular modelo HeLa, realizamos una evaluación comparativa del efecto del tamaño y la carga de las nanopartículas en atravesar la membrana mitocondrial interna (Figuras 9A-D). Tratamos células HeLa con nanopartículas mezcladas dirigidas PLGA-b-PEG-TPP/PLGA-b-PEG-QD de diferentes tamaños pero similar potencial zeta, después realizamos una investigación cuantitativa usando espectrometría de masas acoplada inductivamente a plasma (ICP-MS) para estimar la cantidad de cadmio (Cd) de los QD internalizados por las células. La evaluación de la captación mitocondrial de nanopartículas de 80-330 nm de diámetro mostró una tendencia hacia una captación máxima de partículas de 80 a 100 nm de diámetro. Los histogramas que muestran el número de nanopartículas en las fracciones citosólica y mitocondrial frente al tamaño de nanopartícula indican que la captación celular de nanopartículas es altamente dependiente del tamaño de partícula (Figura 9A-B). Estudiamos el efecto de la carga superficial de nanopartícula en la captación celular y mitocondrial usando una biblioteca de nanopartículas

con cargas superficiales variables pero diámetros hidrodinámicos similares, y no se detectó captación mitocondrial (Figura 9C) y muy poca captación celular global (Figura 9D) de nanopartículas cargadas negativamente. La captación celular aumentó medida que la carga superficial alcanzó 1,3 mV y permaneció constante hasta una carga superficial de ~22 mV, con captación mitocondrial aumentada. Descubrimos otro salto en la captación celular a medida que la carga superficial aumentó a ~34 mV y alcanzó la saturación. La captación mitocondrial aumentó significativamente con las nanopartículas cargadas más positivamente. Esta investigación sistemática del efecto de diámetro y carga superficial de nanopartícula puede ser útil en el diseño de plataformas de nanopartículas optimizadas para transporte mitocondrial.

G. Suministro de compuestos terapéuticos a mitocondrias disfuncionales

Como demostración de prueba de concepto de la versatilidad de este sistema, estudiamos el suministro de compuestos terapéuticos de acción mitocondrial para la gestión de neurodegeneración, obesidad, y cáncer. Sintetizamos nanopartículas dirigidas y no dirigidas cargadas con compuestos terapéuticos con carga y eficacia de encapsulación altas usando el método de nanoprecipitación.

H. Aplicación en enfermedad neurodegenerativa

Las placas de tipo amiloide definen la neuropatología de AD. Las agregaciones del péptido beta amiloide (A β) forman lesiones de tipo amiloide, y por ello la reducción de la carga de amiloide previniendo la formación de A β representa un enfoque atractivo para mejorar el arsenal terapéutico para AD. Se conoce que la curcumina inhibe A β y el estrés oxidativa mitocondrial asociado; sin embargo, su baja biodisponibilidad y fotodegradación son las preocupaciones principales. Con estos problemas en mente, formulamos nanopartículas cargadas de curcumina dirigidas para mejorar la fotoestabilidad y mejorar la captación mitocondrial. Una evaluación de supervivencia *in vitro* de células de neuroblastoma humano IMR-32 tratadas con 20 μ M A β usando el ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] demostró neuroprotección mejorada con las nanopartículas de curcumina dirigidas comparado con las nanopartículas de curcumina no dirigidas o curcumina libre (Figura 10) contra A β , que explica el suministro dirigido de curcumina a las mitocondrias de las células.

I. Aplicación en quimioterapia de cáncer

Las mitocondrias han surgido como una diana específica para el tratamiento de cáncer. Se seleccionaron LND y α -TOS de acción mitocondrial para demostrar la aplicabilidad de nuestro sistema en cáncer. La selectividad y eficacia de LND y α -TOS contra células cancerígenas depende de su disponibilidad para dirigirse a las mitocondrias de las células. Para evaluar la eficacia de nuestras nanopartículas dirigidas en el suministro de LND y α -TOS, realizamos ensayos de MTT en células HeLa. El valor CI50 para nanopartículas LND dirigidas fue ~5 veces menor que para nanopartículas no dirigidas y 108 veces menor que para la forma libre (Figura 11A), indicando un mayor efecto citotóxico. También se observó un mayor efecto citotóxico con nanopartículas α -TOS dirigidas comparado con nanopartículas α -TOS no dirigidas y α -TOS libre (CI50 75 ± 2 nM, 230 ± 4 nM, y 381 ± 5 nM, respectivamente) (Figura 11B). La localización preferencial en el orgánulo diana explica la citotoxicidad aumentada para LND y α -TOS encapsuladas en nanopartículas dirigidas. Nuestro descubrimiento de ningún efecto citotóxico en las nanopartículas vacías PLGA-b-PEG-TPP incluso a altas concentraciones descarta una contribución del sistema de suministro o altos potenciales zeta a cualquier toxicidad celular (Figura 11C).

J. Posible aplicación en obesidad

La obesidad se ha convertido en un problema global de salud debido a su asociación a diversos trastornos metabólicos, incluyendo diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de cáncer. Debido a la eficacia limitada y efectos secundarios indeseables asociados a las medicaciones antiobesidad disponibles actualmente, se ha centrado la atención en desarrollar vehículos de suministro que puedan suministrar directamente fármacos a sitios subcelulares para modular el metabolismo de energía. El notable éxito del desacoplador mitocondrial 2,4-DNP como tratamiento para obesidad humana demuestra que el efecto beneficioso de desacoplar el gasto de energía no se desborda con aumentos compensatorios de ingesta calórica. Sin embargo, la estrecha ventana terapéutica de 2,4-DNP conduce al abandono de su uso. Un estudio reciente descubrió que 2,4-DNP unido a TPP de forma covalente es ineficaz en el desacoplamiento. Las preocupaciones de la estrecha ventana terapéutica y el fallo del desacoplador unido covalentemente han conducido a la evaluación de nanopartículas dirigidas a mitocondrias para dirigir este desacoplador a las mitocondrias de las células. Para examinar si la encapsulación de 2,4-DNP en nanopartículas dirigidas puede suprimir la diferenciación inducida de preadipocitos 3T3-L1 a una dosificación baja que es insuficiente para ejercer citotoxicidad, se expusieron continuamente células 3T3-L1 a nanopartículas 2,4-DNP dirigidas 1 μ M, 4 μ M, 25 μ M y 100 μ M (Figuras 12A-D y 13) durante el periodo de diferenciación durante 7 d, y se evaluaron la viabilidad celular y acumulación lipídica intracelular. Se usaron como controles nanopartículas 2,4-DNP no dirigidas y 2,4-DNP libre. La presencia de nanopartículas 2,4-DNP dirigidas 1 μ M, 4 μ M, o 100 μ M durante 7 d durante el periodo de diferenciación no influyó la viabilidad celular, pero produjo una reducción significativa en la acumulación lipídica comparada con las nanopartículas 2,4-DNP no dirigidas y 2,4-DNP libre (Figuras 12A-D y 13). 2,4-DNP libre a una concentración de 100 μ M demostró toxicidad celular. Estos resultados indican que 2,4-DNP en las nanopartículas dirigidas puede suprimir la diferenciación de adipocitos de

células 3T3-L1 a baja concentración (1 o 4 μM) y no ejercer efecto citotóxico en las células. Demostramos que 2,4-DNP puede suministrarse a las mitocondrias de las células usando un sistema de nanopartículas poliméricas dirigidas para reducir la acumulación lipídica a una dosis inferior comparada con la forma libre para posible aplicación en la gestión de obesidad.

K. Biodistribución y farmacocinética

Se evaluó la biodistribución y farmacocinética y excreción de nanopartículas dirigidas PLGA-*b*-PEG-TPP-QD (NP) en ratas macho Sprague Dawley después de administración intravenosa. La variación de los niveles de Cd en plasma con el tiempo, distribución en órganos, y propiedades descripción se muestran en la Figura 14. Se observó residencia prolongada de NP en plasma de estas NP dirigidas. Entre los órganos estudiados, se observó Cd máximo en el hígado. Estas NP cargadas muy positivamente demostraron rápida excreción hepatobiliar. Estas NP, posiblemente debido a la alta carga positiva, se excretan rápidamente del hígado al tracto gastrointestinal comparado con PLGA-*b*-PEG-COOH-NP cargadas negativamente, que habitualmente permanecen secuestradas en el hígado.

La Figura 15 es una tabla que presenta información más detallada de los datos farmacocinéticos.

CONCLUSIÓN

En este estudio de prueba de concepto, hemos demostrado que un sistema de suministro de nanopartículas basado en PLGA biodegradable dirigido a mitocondrias sometido a ingeniería adecuadamente puede entrar en las mitocondrias de las células con alta eficacia afinando bien carga superficial y tamaño de la nanopartícula. No todos los tipos de nanopartículas tienen la capacidad de entrar en las mitocondrias, porque no pueden atravesar la membrana doble compleja debido a restricciones en programación de carga superficial y tamaño. Ningún informe previo ha examinado la relación entre tamaño y carga de nanopartícula para importación eficaz a las mitocondrias. Este estudio racionalizado que aborda los efectos de carga superficial y diámetro en el transporte intracelular de nanopartículas basadas en PLGA proporciona un enfoque generalizado para el diseño de nanovehículos biodegradables para aplicación en suministro mitocondrial. Estas nanopartículas dirigidas pueden usarse en diversos trastornos relacionados con disfunción mitocondrial, incluyendo AD, obesidad, y cáncer. Este trabajo destaca varias direcciones de investigación excepcionalmente prometedoras y proporciona una plataforma para diversas aplicaciones de nanopartículas basadas en PLGA que pueden integrarse para formación de imágenes.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula dirigida a mitocondrias, que comprende:
 - 5 un polímero director de poli(ácido D.L-láctico-co-glicólico)-b-poli(etilenglicol) catión trifenilfosfonio (PLGA-b-PEG-TPP); y
polímero de PLGA-b-PEG-OH o PLGA-COOH;
donde la nanopartícula tiene un diámetro de 70 a 330 nanómetros y tiene un potencial zeta de más de 0 mV, y
donde la nanopartícula comprende además un agente terapéutico.
 - 10 2. Una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1, donde el diámetro de la nanopartícula está en el intervalo de 80 nanómetros a 100 nanómetros.
 - 15 3. Una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el potencial zeta de la nanopartícula es aproximadamente 7 mV o mayor.
 4. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un punto cuántico.
 - 20 5. Una nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en 2,4-DNP, LND, α -TOS, y curcumina.
 6. Una nanopartícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en el tratamiento de un paciente con riesgo de o que padece una enfermedad asociada a disfunción mitocondrial.
 - 25 7. Una nanopartícula para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en neurodegeneración, obesidad, y cáncer.
 8. La nanopartícula para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la enfermedad es neurodegeneración y el agente terapéutico es curcumina.
 - 30 9. Una nanopartícula para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde
 - (a) la enfermedad es obesidad y el agente terapéutico es 2,4-DNP; o
 - 35 (b) la enfermedad es cáncer y el agente terapéutico se selecciona entre LND o α -TOS.

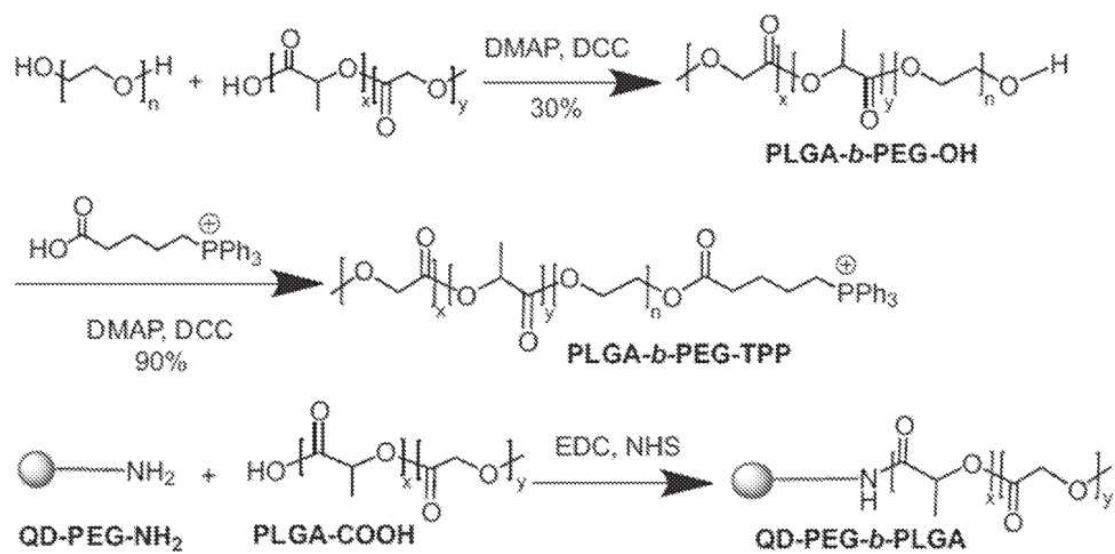


FIG. 1

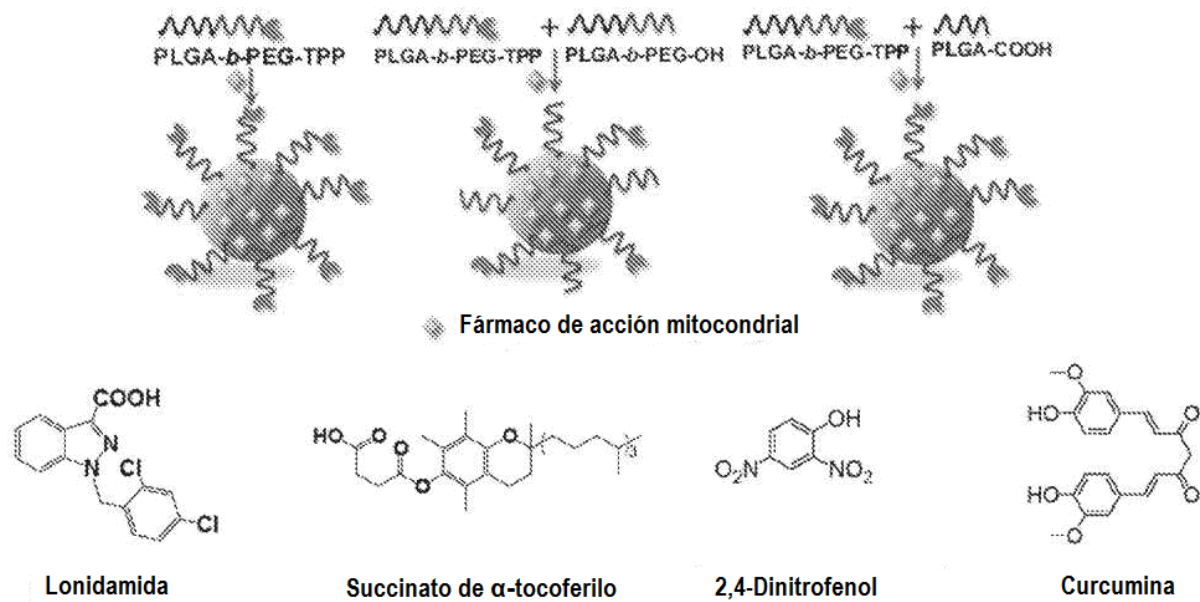


FIG. 2

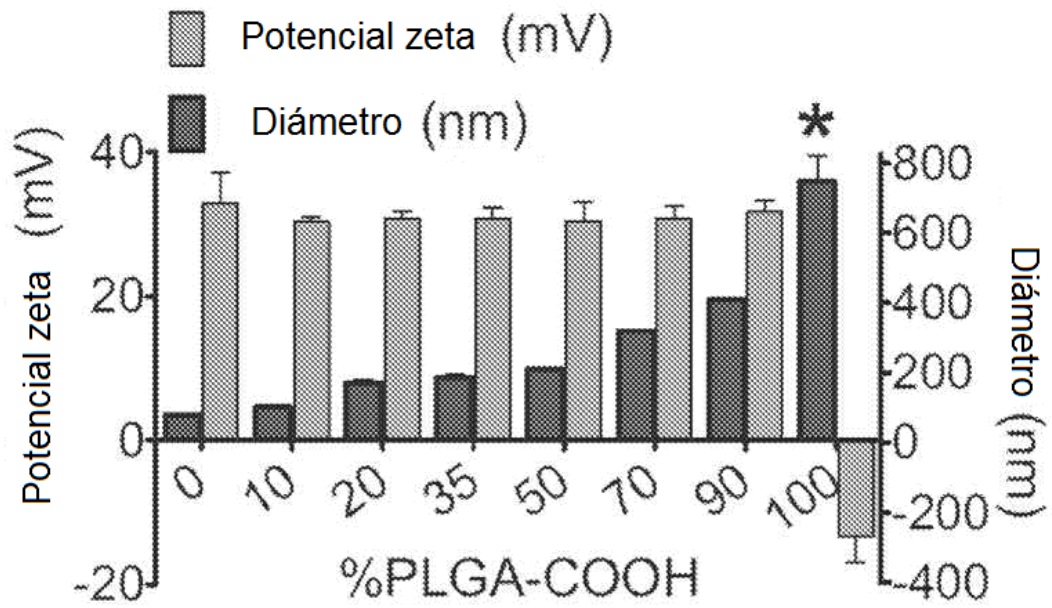


FIG. 3

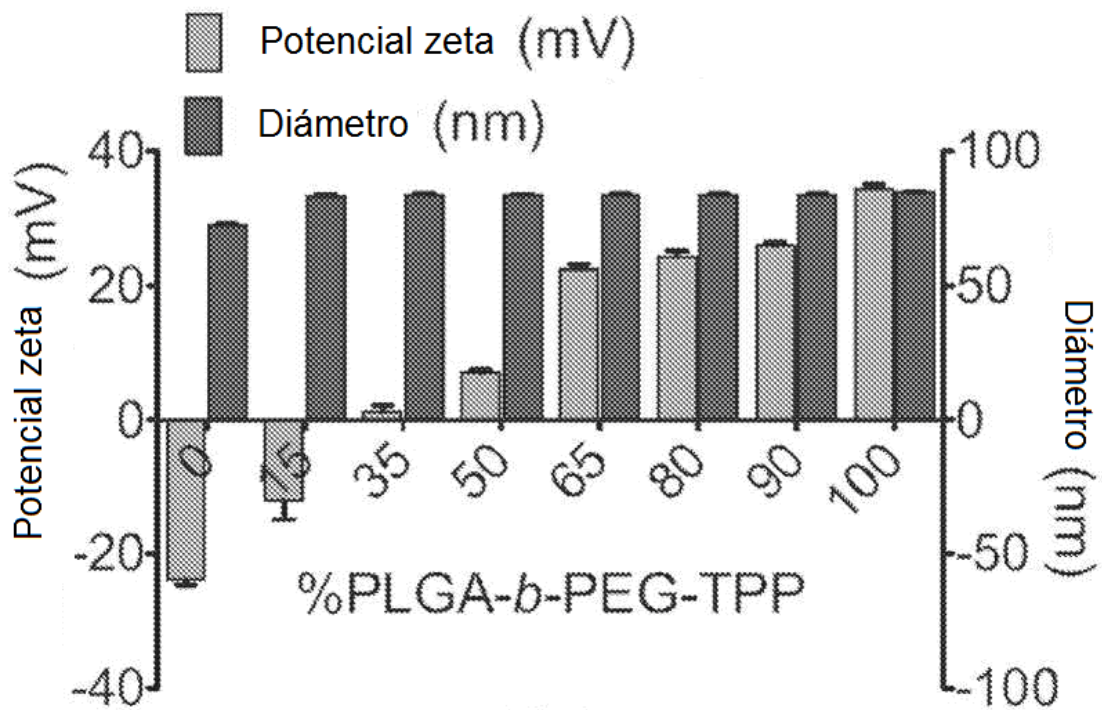


FIG. 4

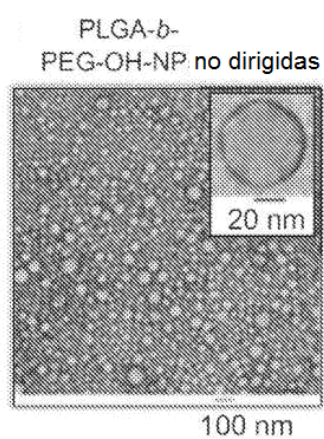


FIG. 5A

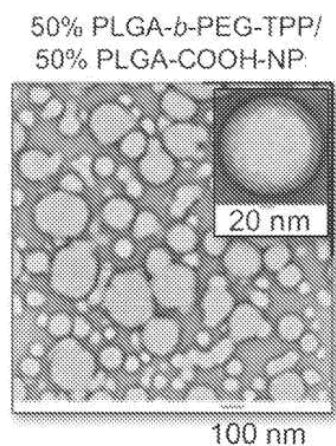


FIG. 5B

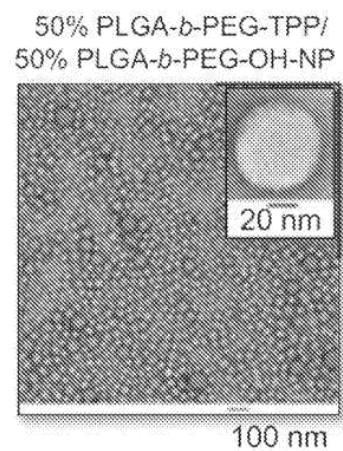


FIG. 5C

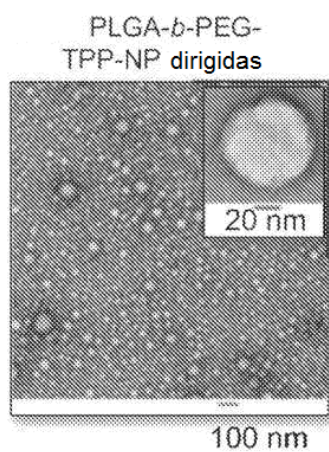


FIG. 5D

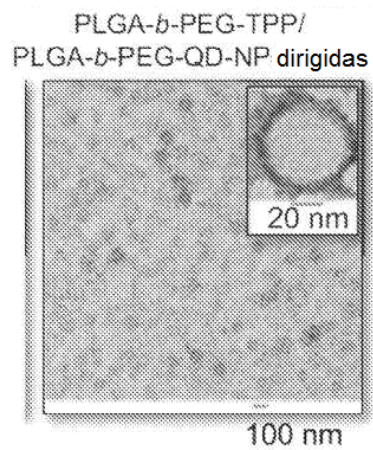


FIG. 5E

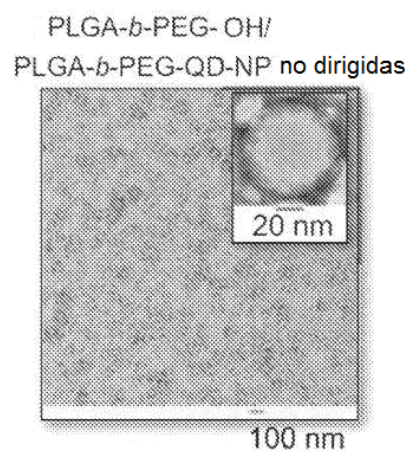


FIG. 5F

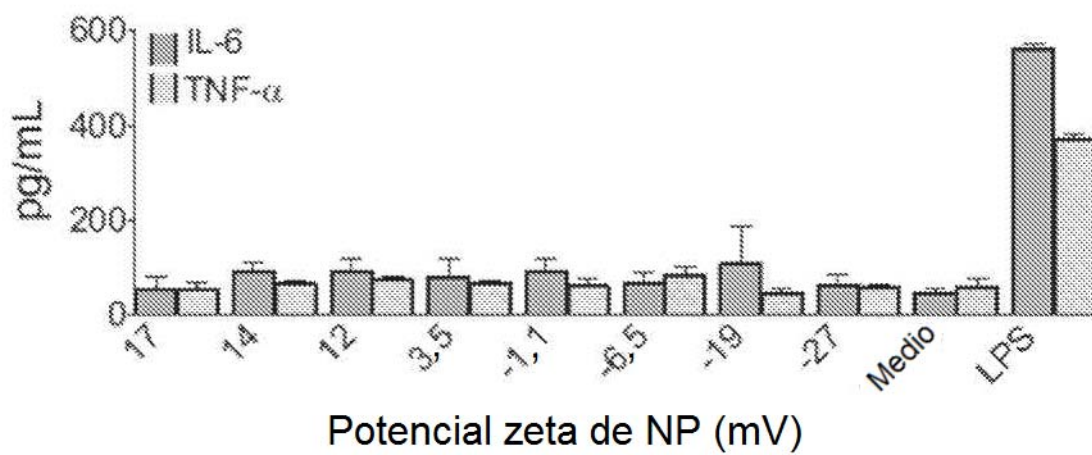


FIG. 6A

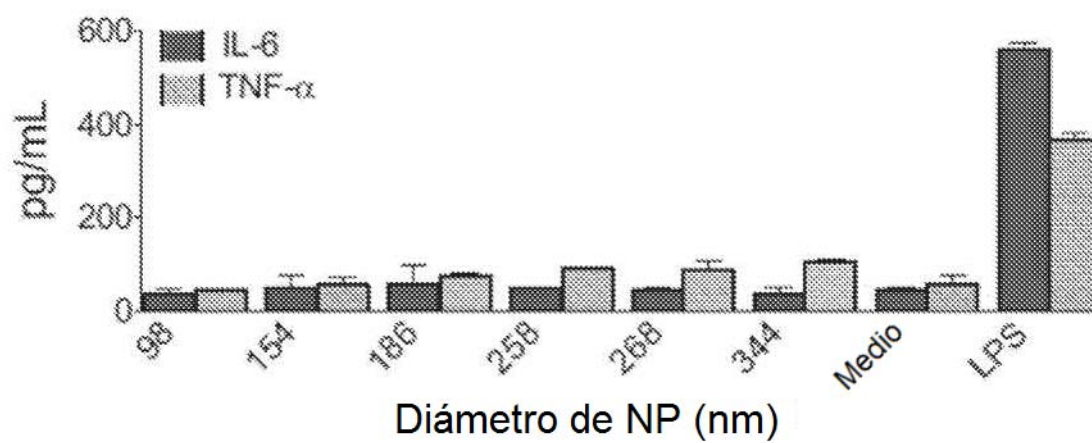


FIG. 6B

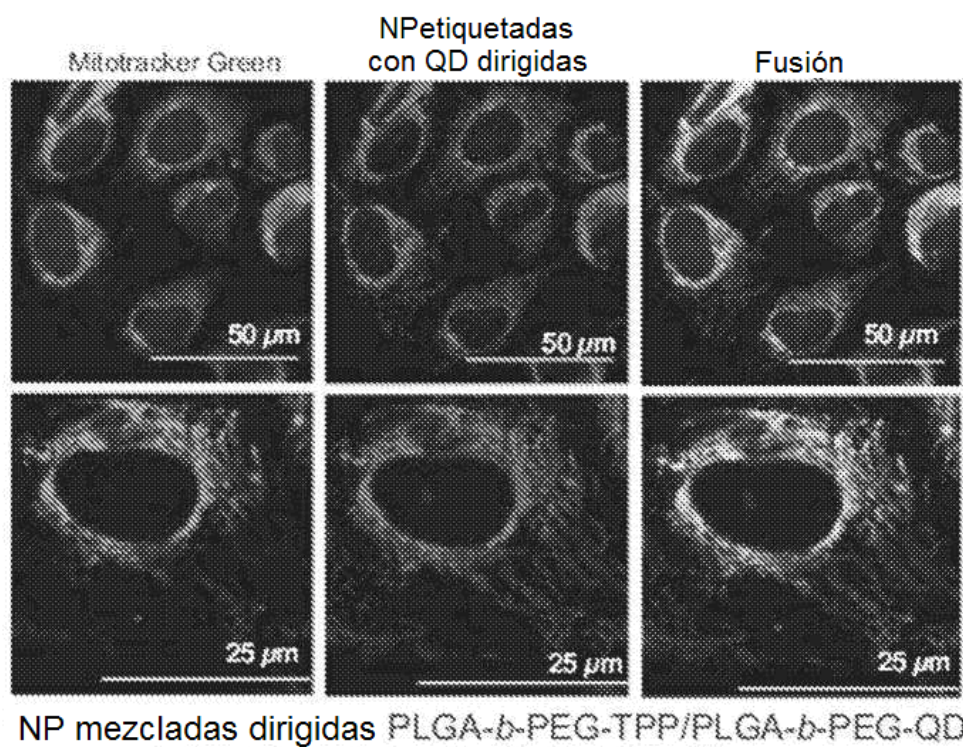


FIG. 7A

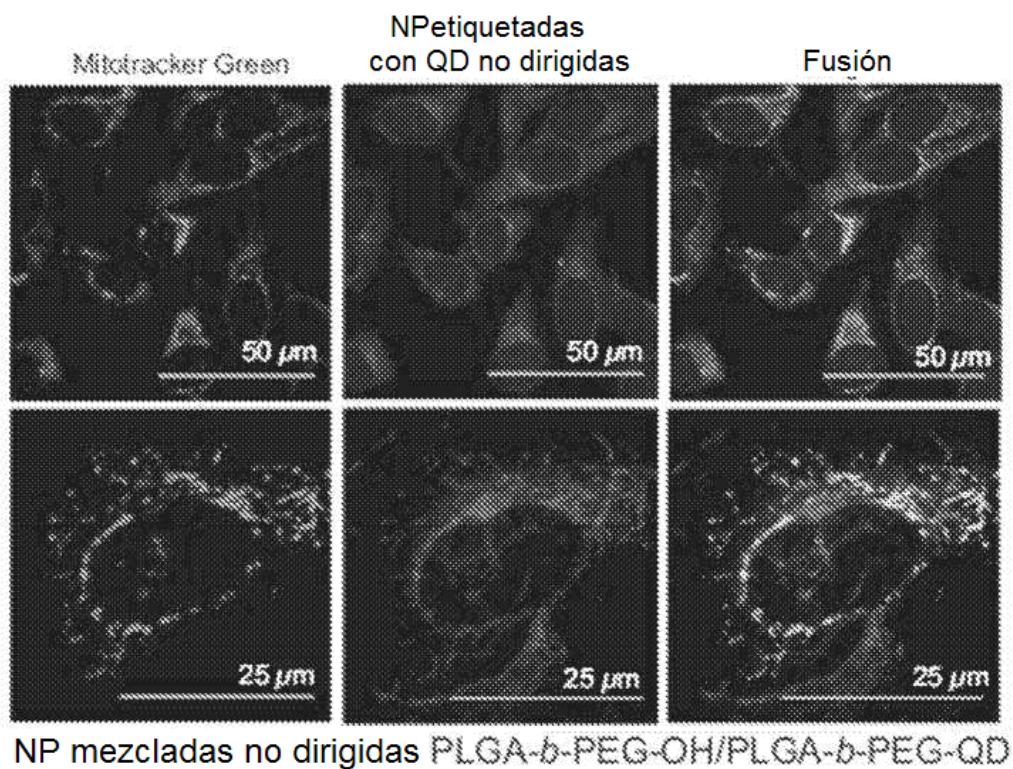
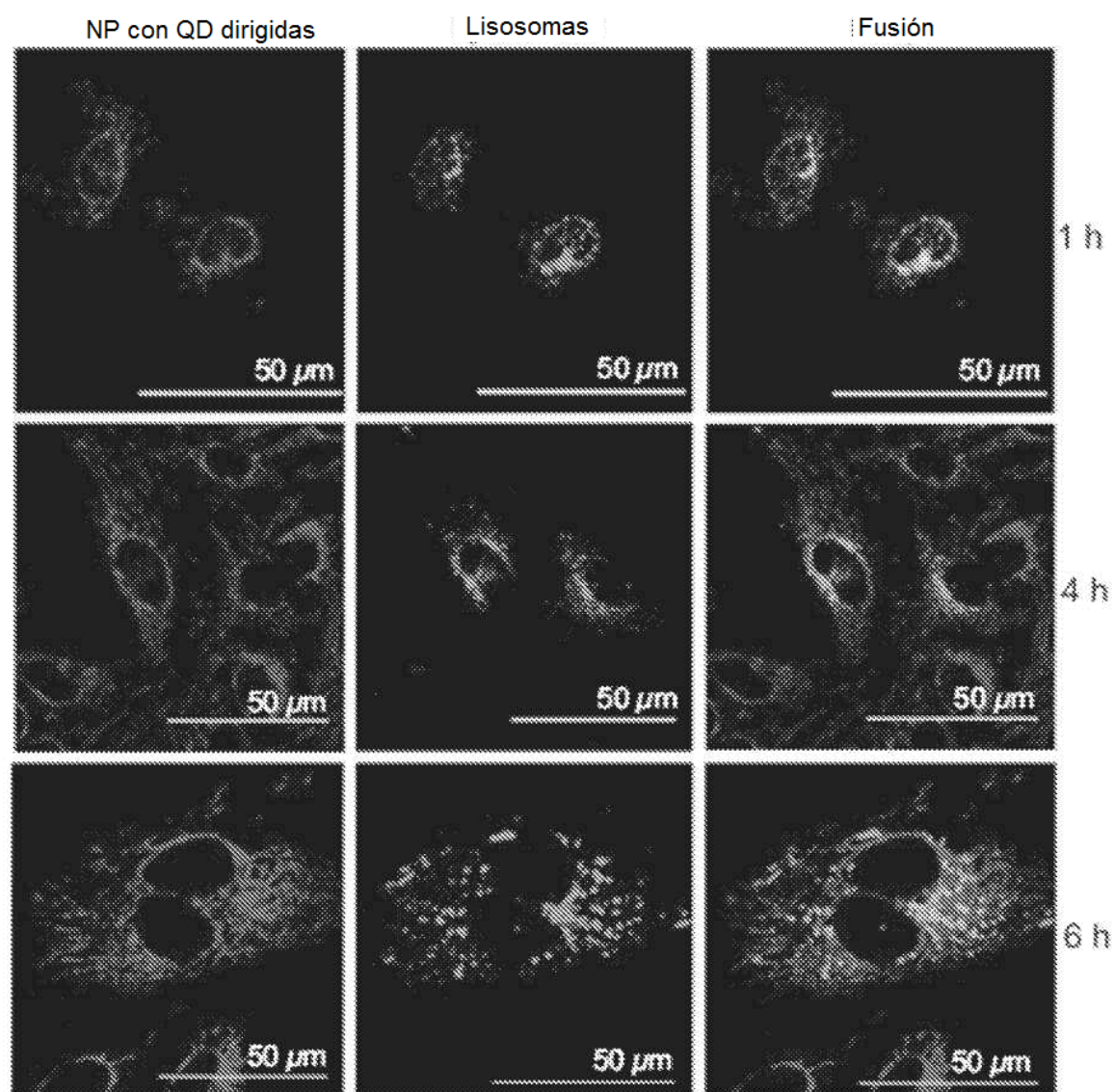


FIG. 7B



NP mezcladas dirigidas PLGA-*b*-PEG-TPP/PLGA-*b*-PEG-QD

FIG. 8A

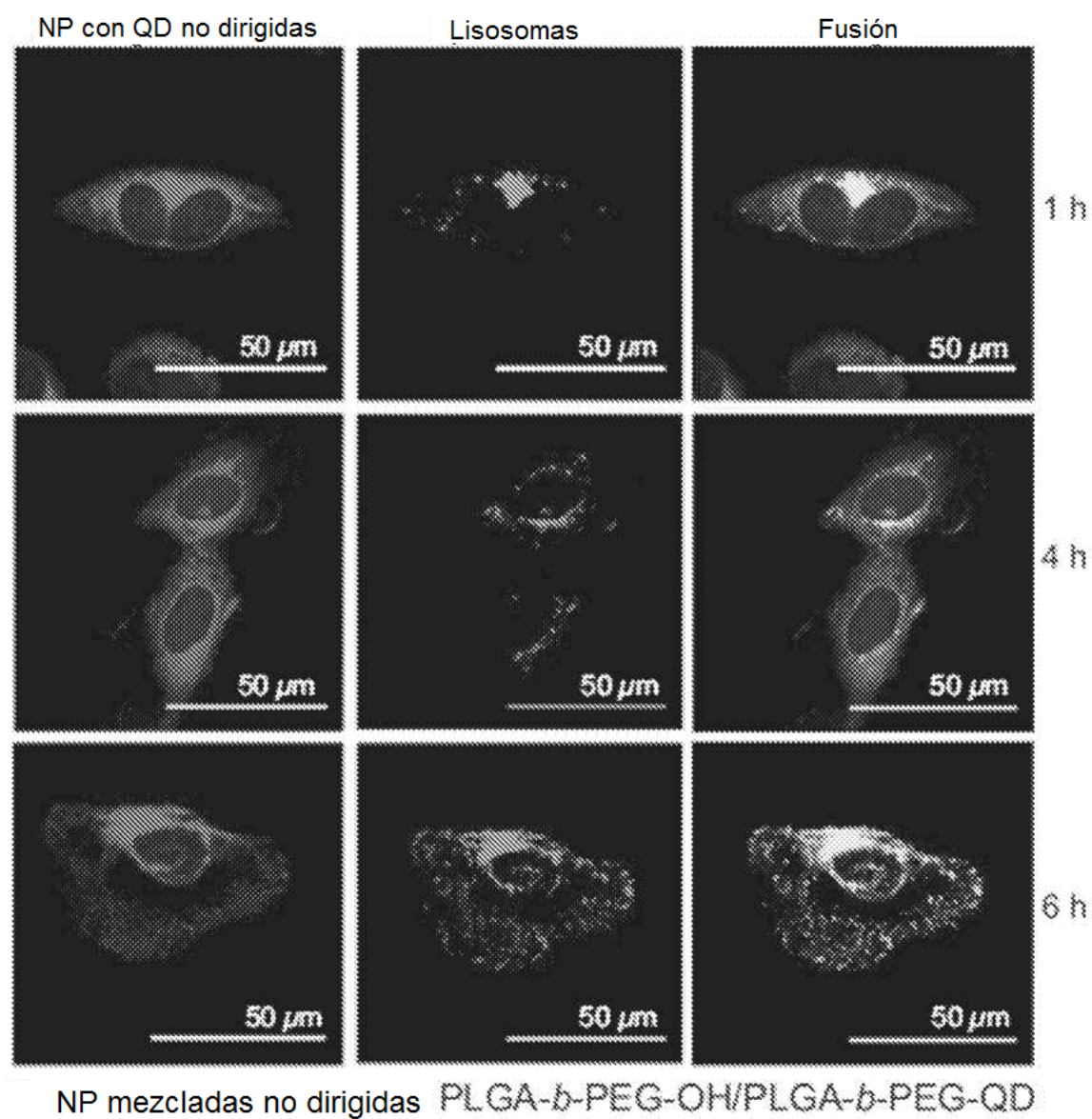


FIG. 8B

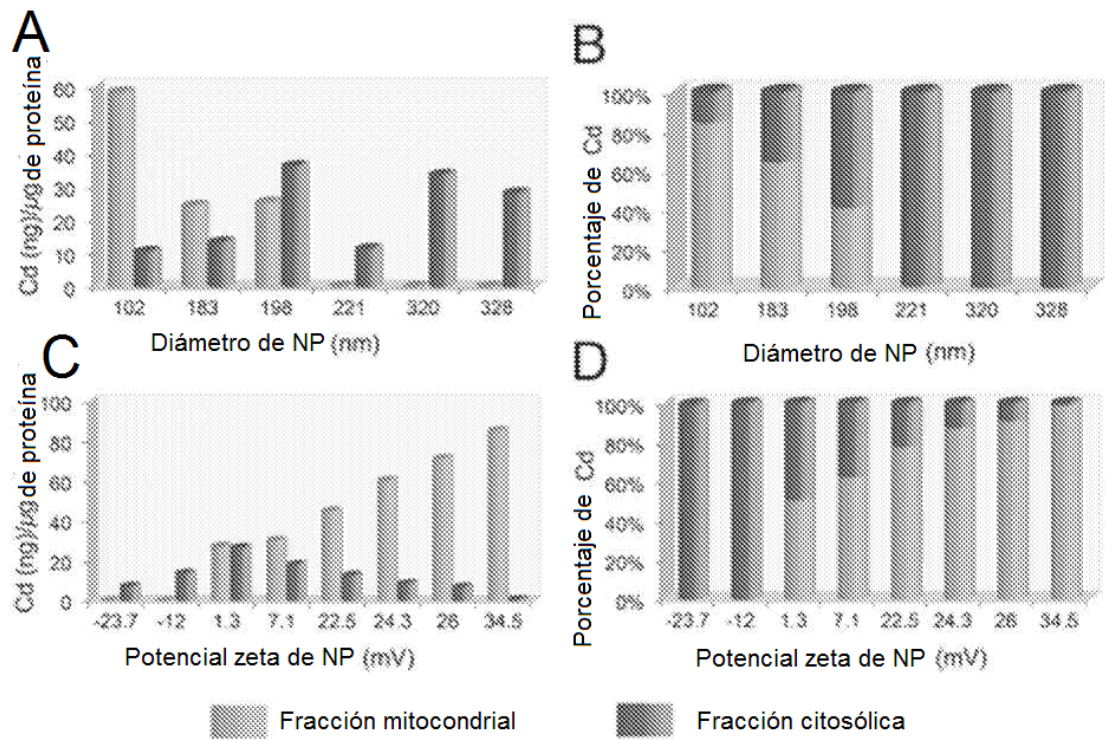


FIG. 9

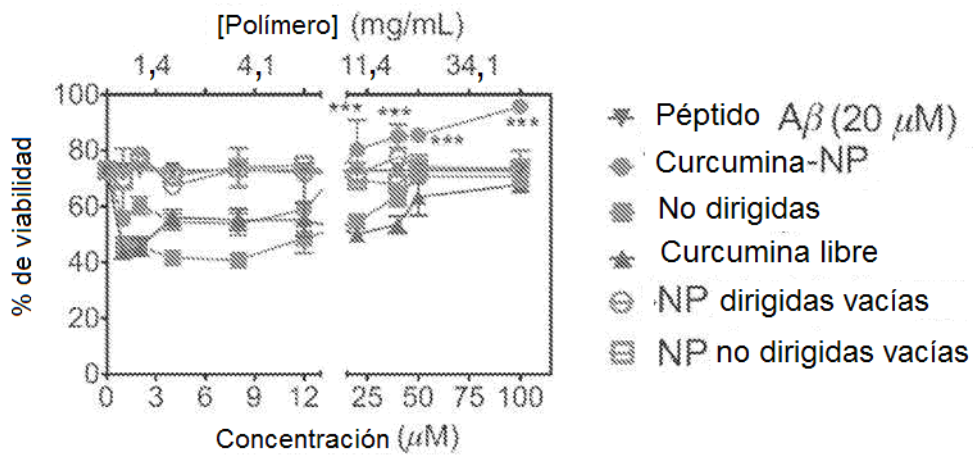


FIG. 10

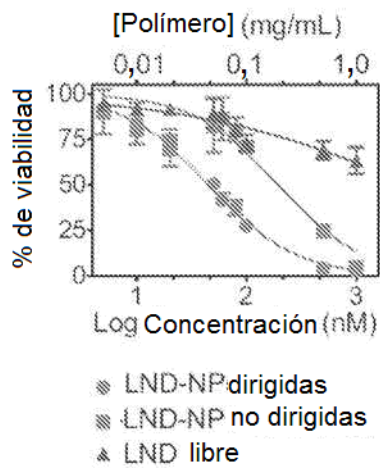


FIG. 11A

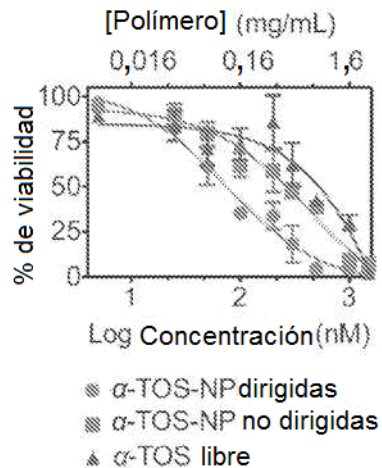


FIG. 11B

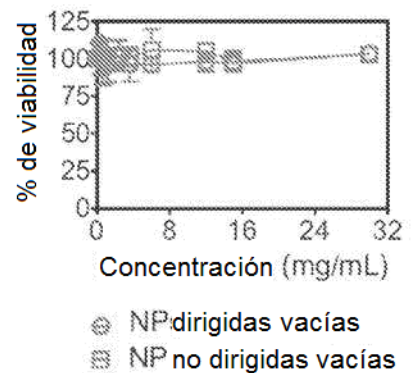


FIG. 11C

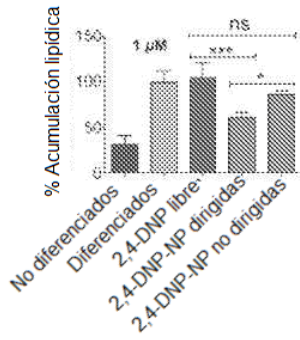


FIG. 12A

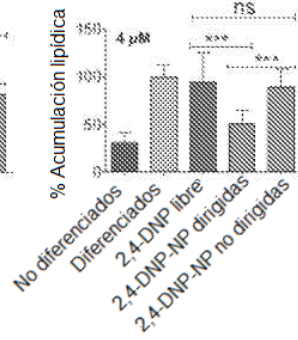


FIG. 12B

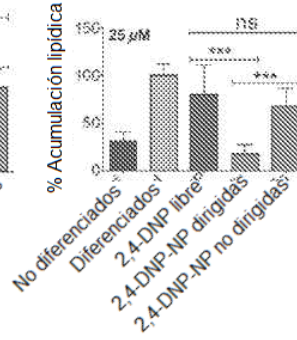


FIG. 12C

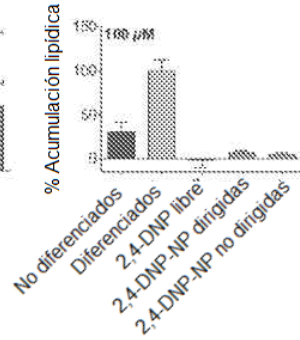


FIG. 12D

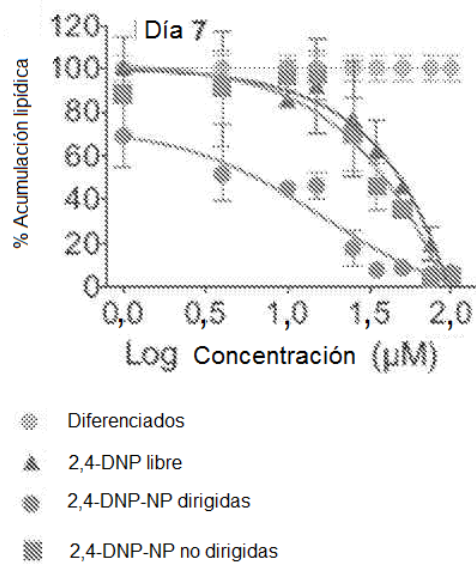


FIG. 13

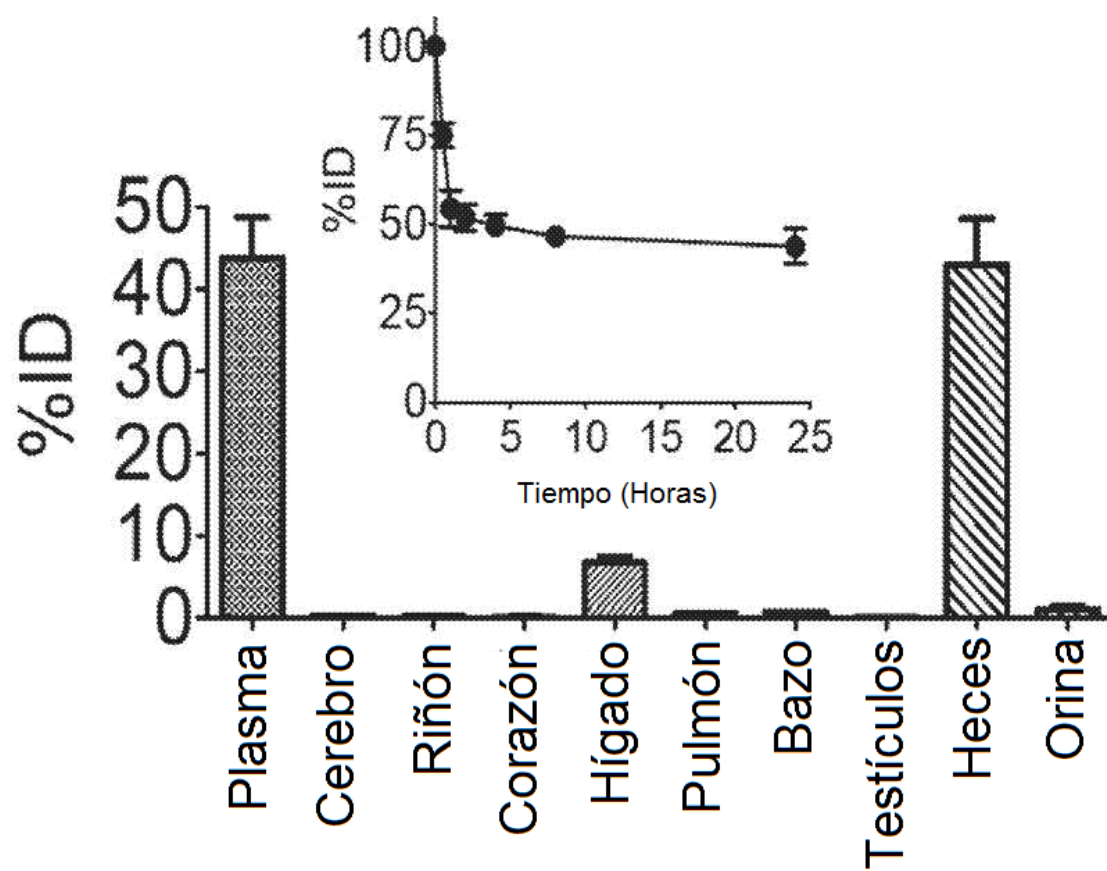


FIG. 14

Dosis (mg/ animal)	Dosis (mg/kg)	Modelo de 2 compartimentos ^[1]						
		AUC _[0-24h] (ng/ml)	C _{max} (ng/ml)	Compartimento central (fase inicial)			Compartimento periférico (fase terminal, a 24 h)	
				Volumen de distribución, compartimento central (ml)	Aclaramiento, t=0 (ml/h)	t _{1/2} (n)	Volumen de distribución, terminal (ml)	Aclaramiento, terminal (ml/h)
24,19 ± 0,28	81,43 ± 0,14	34.784,5 ± 2.117,3	3.237,5 ± 128,2	7,48 ± 0,31	1,40 ± 0,25	2,40 ± 0,77	2,49 ± 0,31	0,015 ± 0,021

[1] Ajuste por mínimos cuadrados para modelo: $A \cdot \exp(-k/t) + B \cdot \exp(-k_2 \cdot t)$:
AUC: Área bajo la curva
t_{1/2}: Semivida de eliminación
C_{max}: Concentración de plasma de pico de nanopartícula después de administración

Valores informados como: (media de grupo) ± (desviación estándar)

FIG. 15