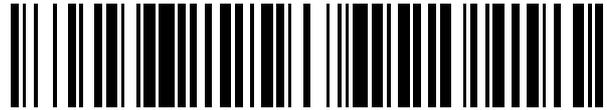


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 750**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2016 PCT/US2016/014076**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2016 WO16118592**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2016 E 16706920 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3247401**

54 Título: **Nanocería quelada con EDDS con actividad de tipo catalasa**

30 Prioridad:

20.01.2015 US 201562125381 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

73 Titular/es:

**CERION LLC (100.0%)
One Blossom Road
Rochester, NY 14610, US**

72 Inventor/es:

BELL, ERIC, LESLIE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 757 750 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanocería quelada con EDDS con actividad de tipo catalasa

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a mejoras en los campos de la nanociencia y la nanomedicina. En particular, la invención se refiere a procedimientos para preparar nanopartículas, a nanopartículas que comprenden materiales biocompatibles, y a nanopartículas con actividad de tipo catalasa. La invención se refiere además al uso de tales nanopartículas para catalizar la eliminación de peróxido de hidrógeno, o para prevenir o tratar enfermedades, más particularmente, para reducir los efectos del estrés oxidativo debido al peróxido de hidrógeno, tal como, mediante
10 la administración de nanopartículas con actividad de tipo catalasa.

Antecedentes de la invención

El estrés oxidativo desempeña un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades humanas, y en particular, de las enfermedades neurodegenerativas. El tratamiento con antioxidantes, que puede reducir, por tanto, especies particulares de radicales libres, puede prevenir el daño tisular y mejorar tanto la supervivencia como el resultado neurológico. El peróxido de hidrógeno es un subproducto de muchos procesos celulares importantes; sin embargo, también es un generador o precursor conocido de radicales libres en entornos fisiológicos. La catalasa es una enzima antioxidante de origen natural (proteína redox) que previene la acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Los fármacos antioxidantes con actividad que imita a la enzima celular catalasa (es decir, actividad de tipo catalasa) pueden retrasar la progresión de diversas enfermedades y eventos relacionados con el estrés oxidativo, tal como el accidente cerebrovascular isquémico.
15

El origen del uso de nanocería en la nanomedicina se remonta al trabajo seminal de Bailey y Rzigalinski, en el que se observó que la aplicación de partículas ultrafinas de óxido de cerio a las células cerebrales en cultivo aumentaba enormemente la capacidad de supervivencia celular, como describe Rzigalinski en in Nanoparticles and Cell Longevity, Technology in Cancer Research & Treatment 4(6), 651-659 (2005). Más en particular, se mostró que los cultivos de células cerebrales de rata in vitro sobrevivieron aproximadamente 3-4 veces más cuando se trataron con nanopartículas de óxido de cerio de 2-10 nanómetros (nm) de tamaño sintetizadas por una técnica de microemulsión de micelas inversas, como divulgan Rzigalinski y otros en la patente de Estados Unidos 7,534,453, presentada el 4 de septiembre de 2003.
25

Posteriormente, una serie de problemas con estas partículas de nanocería en particular fueron divulgados por Rzigalinski y otros en el documento WO 2007/002662. La nanocería producida por la técnica de microemulsión de micelas inversas experimentó lo siguiente: (1) el tamaño de partícula no estaba bien controlado dentro del intervalo de 2-10 nanómetros (nm) informado, haciendo alta la variabilidad entre lotes; (2) los residuos de tensioactivos, tal como el bis(etilhexil)sulfosuccinato de sodio, también conocido como docusato de sodio o (AOT), usado en el proceso sintético de micelas inversas en el producto final provocaron respuestas tóxicas; (3) la incapacidad de controlar la cantidad de residuos de tensioactivos planteó problemas con la aglomeración cuando estas nanopartículas se colocaron en medios biológicos, dando como resultado una eficacia y capacidad de entrega reducidas; y (4) inestabilidad del estado de valencia del cerio (+3/+4) con el tiempo. Por lo tanto, las nanopartículas de óxido de cerio producidas por la técnica de microemulsión de micelas inversas fueron muy variables de un lote a otro, y mostraron una toxicidad superior a la deseada para las células de mamíferos.
30

Como alternativa, Rzigalinski y otros en el documento WO 2007/002662 describen la eficacia biológica de la nanocería sintetizada por técnicas de alta temperatura, obtenida de al menos tres fuentes comerciales. Se informó que estas fuentes alternativas de nanopartículas de óxido de cerio proporcionan una reproducibilidad superior de la actividad de un lote a otro. Se informó además que, independientemente de la fuente, las partículas de óxido de cerio que tienen un tamaño pequeño, una distribución de tamaño estrecha y una baja tasa de aglomeración son las más ventajosas.
35

Estos inventores (Rzigalinski y otros) informan además en ese sentido que para el suministro, las nanopartículas estaban ventajosamente en una forma no aglomerada. Para lograr esto, informaron que las soluciones madre de aproximadamente 10 % en peso de nanocería podrían sonicarse en agua de pureza ultra alta o en solución salina normal preparada con agua de pureza ultra alta. Sin embargo, los inventores han confirmado lo que otros han observado, que las dispersiones acuosas sonicadas de nanocería (sintetizadas por técnicas de alta temperatura y obtenidas de fuentes comerciales) son altamente inestables y se asientan rápidamente (es decir, en minutos), provocando una variabilidad sustancial en la administración de dispersiones acuosas de nanocería derivada de estas fuentes. También se ha observado que la administración de estas dispersiones acuosas sonicadas de nanocería (por ejemplo, obtenida de Sigma-Aldrich) a ratones da como resultado una rápida deposición de ceria en el hígado y los riñones junto con un rápido deterioro en la salud de los animales.
40
45
50
55

Si bien las nanopartículas que contienen óxido de cerio pueden prepararse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica, las partículas requieren típicamente un estabilizador para evitar la aglomeración indeseable.

Con respecto a los estabilizadores de nanocería biocompatibles usados previamente, Masui y otros, J. Mater. Sci. Lett. 21, 489-491 (2002) describen un proceso hidrotérmico de dos etapas que produce directamente dispersiones acuosas estables de nanopartículas de ceria que usa tampón citrato como estabilizador. Sin embargo, este proceso es de tiempo y equipamiento intensivos, requiriendo dos etapas de reacción separadas de 24 horas en reactores cerrados.

5 DiFrancesco y otros en el documento PCT/US2007/077545, METHOD OF PREPARING CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES, presentado el 4 de septiembre de 2007, describen la oxidación de iones cerosos por peróxido de hidrógeno en condiciones altamente ácidas (pH < 4,5) en presencia de estabilizadores de ácido α -hidroxicarboxílico biocompatibles, tal como el ácido láctico, ácido tartárico, ácido glucónico y ácido 2-hidroxi-butanoico. Específicamente, el ácido láctico estabilizador y la combinación estabilizadora de ácido láctico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se muestran en ejemplos de trabajo para producir directamente dispersiones estables de partículas de nanocería de tamaño de partícula promedio en el intervalo de 3-8 nm en condiciones de reacción altamente ácidas.

La patente de Estados Unidos 9,034,392 transferida legalmente describe la oxidación del ion ceroso por el peróxido de hidrógeno en presencia de ácido cítrico (CA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), en la que la relación molar de CA con EDTA varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0, de manera que las dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de cerio estabilizadas se forman directamente en la mezcla de reacción, sin aislamiento de las nanopartículas. Se ha mostrado que las nanopartículas de óxido de cerio estabilizadas con una combinación de CA y EDTA en este intervalo de cantidades molares reducen sinérgicamente la muerte celular debido al estrés oxidativo en un modelo ex vivo de corte cerebral murino de accidente cerebrovascular isquémico.

La solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0322333 transferida legalmente describe la oxidación del ion ceroso por el peróxido de hidrógeno en presencia de ácido cítrico y un quelante seleccionado del grupo que consiste en ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), de manera que las dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de cerio estabilizadas se forman directamente en la mezcla de reacción, sin aislamiento de las nanopartículas. Se ha mostrado que estas nanopartículas de óxido de cerio estabilizadas reducen la muerte celular debido al estrés oxidativo en un modelo ex vivo de corte cerebral murino de accidente cerebrovascular isquémico.

Como se describió anteriormente, se han informado varios procedimientos para preparar dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de cerio biocompatiblemente estabilizadas. Los fármacos antioxidantes con mayor actividad de tipo catalasa reducirán más rápidamente el daño tisular que resulta de una acumulación excesiva de peróxido de hidrógeno y/o pueden permitir una reducción correspondiente en la dosis del fármaco, reduciendo de esta manera el costo del fármaco y/o los efectos secundarios del fármaco para el paciente. Por lo tanto, se mantiene la necesidad de aumentar la actividad de tipo catalasa en dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de cerio estabilizadas.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir una dispersión de nanopartículas, que comprende: formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido etilendiaminodisuccínico, un oxidante, agua y ácido cítrico; opcionalmente, calentar o enfriar la mezcla de reacción; y formar de esta manera en la mezcla de reacción, sin aislamiento de las nanopartículas, una dispersión de nanopartículas de óxido de cerio.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico y ácido cítrico.

40 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de un evento o enfermedad relacionada con el estrés oxidativo, y en particular, una enfermedad del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica, que comprende una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico y ácido cítrico.

45 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un proceso para prevenir (es decir, tratar profilácticamente) un evento relacionado con el estrés oxidativo o una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo, y en particular, una enfermedad del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica, que comprende administrar antes de la aparición de un evento o enfermedad, una cantidad eficaz de una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico, preparada en presencia de ácido cítrico; o una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido etilendiaminodisuccínico y ácido cítrico.

50 En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un proceso de tratamiento de un evento relacionado con el estrés oxidativo, en particular accidente cerebrovascular isquémico, o una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo, y en particular, una enfermedad del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica, que comprende administrar después de la aparición de un evento o enfermedad, una cantidad eficaz de una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico, y preparada en presencia de ácido cítrico; o una nanopartícula que comprende óxido de cerio, ácido etilendiaminodisuccínico y que comprende además ácido cítrico.

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que los elementos no mostrados o descritos específicamente pueden tomar diversas formas bien conocidas por los expertos en la técnica. La invención se define mediante las reivindicaciones.

En la presente solicitud, el término nanopartícula incluye partículas que tienen un diámetro medio de menos de 100 nm. Para los fines de esta descripción, a menos que se indique lo contrario, el diámetro de una nanopartícula se refiere a su diámetro promedio de partícula cristalográfica, que puede estimarse mediante un análisis de ancho de picos de los espectros de difracción de rayos X de polvos (XRD) mediante el uso de la ecuación de Scherrer. Alternativamente, el diámetro de partícula geométrico puede estimarse mediante análisis de micrografías electrónicas de transmisión (TEM). Alternativamente, el diámetro hidrodinámico, que incluye adsorbatos moleculares y la cubierta de solvatación anexa de la partícula, puede determinarse mediante técnicas de dispersión dinámica de la luz. Además, para distribuciones de tamaño de nanopartículas sustancialmente monodispersas que tienen un tamaño geométrico en el intervalo de 1-10 nm, la XRD puede además revelar un pico de dispersión de ángulo muy bajo que es una medida directa del tamaño de los centros de dispersión.

En la presente divulgación, las partículas descritas como "sustancialmente no aglomeradas" tienen un diámetro hidrodinámico menor o igual al doble del diámetro de la cristalita determinado por XRD mediante el uso del procedimiento de Scherrer.

En esta divulgación, el término "metal" en referencia a elementos de la Tabla Periódica incluye todos los elementos distintos de los de los siguientes números atómicos: 1-2, 5-10, 14-18, 33-36, 52-54, 85 y 86.

Se entiende que el término "metal de transición" abarca los 30 elementos químicos de número atómico 21 a 30, 39 a 48, 57 y 72 a 80, que se incluyen en los Períodos 4, 5, 6, respectivamente, de la Tabla Periódica.

Se entiende que el término "metal de tierras raras" abarca los 14 elementos químicos lantánidos de número atómico 58 a 71, y los 14 elementos químicos actínidos de número atómico 90 a 103.

Se entiende que el término "metal alcalino" abarca los 6 elementos químicos que forman el Grupo 1 de la Tabla Periódica, los de número atómico 3, 11, 19, 37, 55 y 87.

Se entiende que el término "metal alcalinotérreo" abarca los 6 elementos químicos que forman el Grupo 2 de la Tabla Periódica, los de número atómico 4, 12, 20, 38, 56 y 88.

El término químico "ácido etilendiaminodisuccínico" se conoce alternativamente por nombres químicos tales como ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico; ácido N,N'-etilendiamino disuccínico; Ácido L- etilendiaminodisuccínico; ácido N,N'-etilendiaspártico; ácido 2-[2-(1,2-dicarboxietilamino)etilamino]butanodioico (nombre IUPAC); Número de CAS 20846-91-7; fórmula molecular $C_{10}H_{16}N_2O_8$; y las siglas EDDS y EDSS. Existen dos centros quirales en la estructura de EDDS, dando lugar a dos isómeros enantioméricos: [R,R']-EDDS y [S,S']-EDDS, y un mesoisómero [R,S]-EDDS. [S,S']-EDDS ha estado disponible comercialmente bajo los nombres comerciales Enviomet C265 y Natriquest E30, y se sabe que es biodegradable.

Se entiende además que el término químico "ácido etilendiaminodisuccínico" abarca cualquier sal del mismo, que comprende, por ejemplo, el producto de reacción del ácido etilendiaminodisuccínico con una base, tal como, por ejemplo, un hidróxido de metal alcalino, tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. De esta manera, uno o más de los protones ácidos en el ácido etilendiaminodisuccínico se reemplazan por otro catión, tal como, por ejemplo, un catión de metal alcalino o un catión de metal alcalinotérreo. Por lo tanto, pueden formarse sales de metales mono, di, tri y tetraalcalinos de etilendiaminodisuccinato. Por ejemplo, una solución acuosa de sal trisódica de ácido [S,S']-Etilendiamino-N, N'-disuccínico está disponible comercialmente en Sigma-Aldrich (número de catálogo 92698).

Se entiende que el término químico "ácido cítrico" incluye sales del mismo, tales como, por ejemplo, sales de cationes metálicos de anión citrato. De esta manera, uno o más de los protones ácidos en el ácido cítrico se reemplazan por otro catión, tal como, por ejemplo, un catión de metal alcalino o un catión de metal alcalinotérreo.

En la presente solicitud, se entiende que el término "cristalino" describe un material que muestra al menos un pico de rayos X o de difracción de electrones (excluyendo picos de XRD de ángulo muy bajo no asignables a una estructura cristalina), en el que la intensidad del pico es perceptiblemente mayor que la dispersión de fondo (ruido de la línea de base). Se entiende que los términos "semicristalinos" o "parcialmente cristalinos" describen un material que muestra sólo picos amplios de difracción de electrones o de rayos X de baja intensidad máxima debido a la falta de un orden de largo alcance. Se entiende que el término "amorfo" describe un material que no muestra ningún pico de difracción de rayos X o de electrones (excluyendo los picos de XRD de ángulo muy bajo no asignables a una estructura cristalina).

En la presente solicitud, diversos materiales que contienen cerio se describen nominalmente como una fase "ceria", fase "óxido de cerio" o fase "dióxido de cerio". Un experto en la técnica química entenderá que los aniones oxídicos reales presentes en estos materiales pueden comprender aniones de óxido o aniones de hidróxido, o mezclas de los mismos, tales como fases de óxido hidratado (por ejemplo, oxihidróxido). Además, se sabe que las composiciones de materia pueden estar compuestas de soluciones sólidas de cationes multivalentes, y se denominan sólidos no estequiométricos. Por lo tanto, para las fases de óxido en masa compuestas de cationes metálicos de múltiples estados de oxidación, se entiende que la cantidad total de aniones oxídicos presentes estará determinada por las cantidades

específicas de los diversos estados de oxidación de los cationes metálicos presentes, por ejemplo, iones cerosos (Ce^{3+}) e ion cérico (Ce^{4+}), de manera que se mantenga la neutralidad de carga. Para las fases no estequiométricas nominalmente descritas como dióxidos metálicos, esto se incorpora en la fórmula química $\text{MO}_{2-\delta}$ en el que el valor de δ (delta) puede variar.

- 5 Para un óxido de cerio, $\text{CeO}_{2-\delta}$, el valor de δ (delta) típicamente varía de 0,0 a 0,5, el primero denota óxido de cerio (IV), CeO_2 , el último denota óxido de cerio (III), $\text{CeO}_{1,5}$ (alternativamente denotado Ce_2O_3). Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría en particular, el valor de δ (delta) puede interpretarse como la cantidad de vacantes de oxígeno presentes con relación al óxido de cerio (IV) (CeO_2). Por cada vacante de di-anión de oxígeno presente, dos iones cerosos (Ce^{3+}) están presentes, para preservar la neutralidad de la carga.
- 10 En la presente solicitud, se entiende que el término "dióxido de cerio" describe el óxido de cerio (IV) (CeO_2).
- En la presente solicitud, se entiende que el término "ceria" describe un óxido de cerio que comprende ion cérico (es decir, Ce^{4+} o ion de cerio (IV), que abarca una gama de materiales no estequiométricos descritos por la fórmula química, $\text{CeO}_{2-\delta}$, en la que el valor de δ (delta) varía de 0,0 a menos de 0,5.
- 15 En la presente solicitud, los términos "partículas de nanoceria" y "nanopartículas de ceria" tienen el mismo significado y se usan indistintamente.
- De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un proceso que comprende: formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido etilendiaminodisuccínico, un oxidante y agua; y después de eso formar en la mezcla de reacción una dispersión de nanopartículas de ceria.
- 20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso que comprende: formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido cítrico, ácido etilendiaminodisuccínico, un oxidante y agua; y después de eso formar en la mezcla de reacción una dispersión de nanopartículas de ceria.
- En una realización particular, la dispersión de nanopartículas se forma directamente en la mezcla de reacción, sin aislamiento de las nanopartículas.
- 25 En realizaciones particulares, la mezcla de reacción se calienta o enfría a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0°C a aproximadamente 100°C . En realizaciones particulares, la mezcla de reacción se calienta o enfría a temperaturas superiores a 20°C , o inferiores o iguales a 20°C . En diversas realizaciones, la mezcla de reacción se calienta o enfría a temperaturas superiores a aproximadamente 30°C , aproximadamente 40°C , aproximadamente 50°C , aproximadamente 60°C , aproximadamente 70°C , aproximadamente 80°C o aproximadamente 90°C .
- 30 En realizaciones que emplean temperaturas de reacción elevadas, la duración del tiempo a temperatura elevada puede variar ampliamente, por ejemplo, de minutos a horas. En realizaciones particulares, se mantiene una temperatura de reacción en el intervalo de aproximadamente 40°C a aproximadamente 100°C durante un tiempo que varía de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas.
- 35 En realizaciones particulares, las nanopartículas formadas se deshidratan, deshidroxilan o desprotonan por calentamiento de la mezcla de reacción.
- En una realización particular, la cristalinidad de las nanopartículas formadas se mejora calentando la mezcla de reacción.
- En diversas realizaciones, la fuente de ion ceroso en la mezcla de reacción es una sal soluble en agua de ion ceroso, tal como, por ejemplo, nitrato ceroso, acetato ceroso o una sal hidratada del mismo.
- 40 En diversas realizaciones, la mezcla de reacción o las nanopartículas formadas comprenden una cantidad menor de un ion metálico distinto de un ion de cerio, tal como, por ejemplo, un ion de metal de transición, un ion de metal de tierras raras distinto del cerio, un ion de metal alcalinotérreo o un ion de metal alcalino. En realizaciones particulares, el ion metálico distinto de un ion de cerio es un ion de hierro, tal como un ion ferroso o un ion férrico. En otras realizaciones particulares, el ion metálico es un ion de platino, paladio, níquel o cobre.
- 45 En diversas realizaciones, el oxidante incluye compuestos más oxidantes que el oxígeno molecular (o una atmósfera ambiental de aire). En realizaciones particulares, el oxidante tiene un potencial de reducción de media celda acuosa mayor de $-0,13$ voltios con relación al electrodo de hidrógeno estándar. En realizaciones particulares, el oxidante es un perclorato, clorato, hipoclorito o persulfato de metal alcalino o de amonio; ozono, un peróxido, tal como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hidroperóxido de terc-butilo; o una combinación de los mismos.
- 50 En diversas realizaciones, la cantidad de oxidante empleado varía ampliamente en relación con la cantidad total de iones metálicos oxidables presentes. En realizaciones particulares, la cantidad molar de oxidante presente es igual o mayor que la cantidad molar total de iones metálicos oxidables. En realizaciones específicas, los oxidantes de dos electrones, tal como el peróxido de hidrógeno, están presentes en al menos la mitad de la concentración molar de iones metálicos oxidables totales, tal como el ion ceroso o el ion ferroso.

En diversas realizaciones, el oxidante se añade a la mezcla de reacción solo o simultáneamente con uno o más de los otros reactivos.

En una realización particular, se pasa oxígeno molecular a través de la mezcla de reacción.

5 En diversas realizaciones, el pH de la mezcla de reacción se ajusta mediante la adición de un ácido o base a un valor mayor que 4,5, mayor que 5,0, mayor que 6,0, mayor que 7,0, mayor que 8,0, mayor que 9,0 o mayor que 10,0 o mayor que 11,0.

En diversas realizaciones, las nanopartículas se usan para tratar tejidos biológicos o medios biológicos, y se ajustan a condiciones de pH fisiológico que varían de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,0 o de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,4.

10 En realizaciones particulares, la mezcla de reacción se ajusta a un pH dentro de condiciones fisiológicas adecuadas. En otras realizaciones, la dispersión del producto final de nanopartículas de ceria se ajusta a un pH dentro de condiciones fisiológicas adecuadas.

15 En diversas realizaciones, la mezcla de reacción se forma en un reactor discontinuo, un reactor continuo o un molino coloidal. En realizaciones particulares de un reactor continuo, se usa un reactor de tanque agitado continuo o un reactor de flujo de pistón.

20 Las realizaciones particulares, diversos dispositivos de mezcla conocidos en la técnica se emplean para batir, mezclar, cortar o agitar los contenidos de la mezcla de reacción. En diversas realizaciones, se usan mezcladores que comprenden barras agitadoras, hélices de palas marinas, turbinas de palas inclinadas o turbinas de palas planas. En realizaciones particulares, se emplea un molino coloidal o un mezclador de alto cizallamiento Silverson®. En una realización particular, se emplea un mezclador de alto cizallamiento que obliga a la mezcla de reacción a pasar a través de un tamiz, en el que los agujeros varían en tamaño desde fracciones de un milímetro a varios milímetros. En realizaciones particulares, uno o más de los reactivos se introducen debajo de la superficie de la mezcla de reacción acuosa. En una realización particular, se introduce un reactivo debajo de la superficie de la mezcla de reacción acuosa en estrecha proximidad a un dispositivo de mezclado.

25 En diversas realizaciones, las nanopartículas formadas son amorfas, semicristalinas o cristalinas. Las nanopartículas cristalinas pueden describirse alternativamente como cristalitas de partículas individuales o como cristalitas individuales. En realizaciones particulares, las nanopartículas formadas se caracterizan por una estructura cristalina de óxido de cerio. En una realización particular, las nanopartículas formadas se caracterizan por una estructura cristalina cúbica de fluorita.

30 En diversas realizaciones, las nanopartículas formadas tienen un diámetro hidrodinámico inferior a 100 nm, inferior a 80 nm, inferior a 60 nm, inferior a 40 nm, inferior a 20 nm, inferior a 10 nm, inferior a 5,0 nm o menos de aproximadamente 2,0.

En una realización particular de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende cerio y ácido etilendiaminodisuccínico.

35 En una realización particular de la invención, se proporciona una nanopartícula que comprende cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.

En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ion cérico y ácido etilendiaminodisuccínico.

40 En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ion cérico, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.

En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ceria y ácido etilendiaminodisuccínico.

En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ceria, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.

45 En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ácido etilendiaminodisuccínico y un óxido de cerio, hidróxido de cerio u oxihidróxido de cerio.

En una realización particular, se proporciona una nanopartícula que comprende ácido cítrico, ácido etilendiaminodisuccínico y un óxido de cerio, hidróxido de cerio u oxihidróxido de cerio.

50 En diversas realizaciones, el potencial zeta de la nanopartícula se altera mediante el ajuste del pH, el contenido de ácido cítrico, el contenido de ácido etilendiaminodisuccínico o una combinación de los mismos; de la dispersión de nanopartículas.

- 5 En una realización particular, la dispersión de nanopartículas formada se lava para eliminar el exceso de iones o sales de subproductos. En diversas realizaciones, la dispersión de nanopartículas se lava de tal manera que la conductividad iónica se reduce a menos de aproximadamente 15 milisiemens por centímetro (mS/cm), menos de aproximadamente 10 mS/cm, menos de aproximadamente 5 mS/cm o menos de aproximadamente 3 mS/cm. En realizaciones particulares, la dispersión de nanopartículas formada se lava sin aislamiento de las nanopartículas, tal como, por ejemplo, por diálisis o diafiltración, de manera que se mantiene una dispersión estable de nanopartículas.
- 10 En realizaciones particulares, las dispersiones de nanopartículas formadas se concentran para eliminar el exceso de solvente o el exceso de agua. En realizaciones particulares, la dispersión de nanopartículas se concentra por diafiltración o centrifugación.
- 15 En diversas realizaciones, la concentración de nanopartículas en la dispersión es mayor que aproximadamente 0,05 molal, mayor que aproximadamente 0,5 molal o mayor que aproximadamente 2,0 molal (aproximadamente 35 % de sólidos en una dispersión dada).
- En realizaciones particulares, la distribución de tamaño de las nanopartículas es sustancialmente monomodal. En diversas realizaciones, la distribución de tamaño de nanopartículas tiene un coeficiente de variación (COV) menor que aproximadamente 30 %, menor que aproximadamente 25 %, menor que aproximadamente 20 %, menor que aproximadamente 15 %, menor que aproximadamente 10 % o menor que aproximadamente 5 %, donde el COV se define como la desviación estándar dividida por la media.
- 20 En una realización de la invención, se emplea un proceso de cambio de solvente de la dispersión acuosa de nanopartículas a una composición de solventes menos polares por procedimientos descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 8,679,344 transferida legalmente. En una realización específica, la dispersión de nanopartículas se pasa a través de una columna de diafiltración junto con la adición de un diluyente orgánico. En una realización específica, el diluyente orgánico comprende un tensioactivo, tal como, por ejemplo, uno o más alcoholes o glicol éteres.
- 25 Sin estar sujeto a ninguna teoría, el uso propuesto de nanocería biocompatiblemente estabilizada para la prevención y/o tratamiento de eventos y enfermedades relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo (por ejemplo, enfermedades mediadas por especies reactivas del oxígeno (ROS)) se basa en parte en la creencia de que los óxidos de cerio pueden funcionar como depuradores catalíticos de radicales libres. La existencia y la fácil interconversión del cerio en una mezcla de los estados de valencia de Ce^{3+} y Ce^{4+} pueden permitir que los óxidos de cerio reduzcan y/u oxiden los radicales libres a especies menos dañinas de manera catalítica o auto regenerativa. Pueden producirse reacciones redox en la superficie de las nanopartículas de óxido de cerio que neutralizan los radicales libres que dañan los tejidos. Por ejemplo, se cree que sea deseable oxidar el anión superóxido (O_2^-) a oxígeno molecular, oxidar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) a especies fisiológicamente benignas y reducir el radical hidroxilo ($\cdot OH$) a anión hidróxido. Esto a su vez puede permitir un régimen de dosificación muy reducido en comparación con, por ejemplo, los antioxidantes de sacrificio actualmente disponibles para tratar enfermedades y eventos relacionados con el estrés oxidativo.
- 30 35 En realizaciones particulares, las partículas de nanocería administradas se introducen en las células a través de las membranas celulares y residen en el citoplasma celular o en diversos organelos celulares, tales como las mitocondrias y el núcleo. En otras realizaciones, las partículas de nanocería residen en espacios intravasculares o intersticiales, en los que pueden reducir el estrés oxidativo y la inflamación al reducir la acumulación de peróxido de hidrógeno o mediante la eliminación de los radicales libres o la reducción de las respuestas autoinmunitarias. En una realización particular, la invasión del sistema inmunitario al sistema nervioso central como resultado de la ruptura de la barrera hematoencefálica (BBB) o de la barrera sangre-fluido cefalorraquídeo (BCFB) o la barrera sangre-ocular (BOB) está modulada por partículas de nanocería.
- 40 En otra realización, las partículas de nanocería son partículas capaces de cruzar una barrera hematoencefálica de mamífero. En diversas realizaciones, las partículas de nanocería atraviesan una barrera hematoencefálica de mamíferos y se asientan en los tejidos del parénquima cerebral como agregados o aglomerados de un tamaño inferior a aproximadamente 100 nm, inferior a aproximadamente 50 nm, inferior a aproximadamente 20 nm, inferior a aproximadamente 10 nm, inferior de aproximadamente 5 nm. En diversas realizaciones, las partículas de nanocería atraviesan una barrera hematoencefálica de mamíferos y residen en los tejidos del parénquima cerebral como nanopartículas independientes, no aglomeradas de un tamaño de menos de aproximadamente 30 nm, de menos de aproximadamente 5 nm, de menos de aproximadamente 4 nm, de menos de aproximadamente 3 nm y de menos de aproximadamente 2 nm.
- 45 50 En realizaciones particulares, una composición farmacéutica comprende nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico; o nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico y que se preparan en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico.
- 55 En realizaciones particulares, una composición farmacéutica comprende nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico; o nanopartículas que

contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio preparadas en presencia de ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.

5 En diversas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico; o nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico preparadas en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico; se administra a un sujeto humano o no humano tal como otro mamífero, que incluye, pero sin limitarse a, un canino, un felino, un bovino, un equino, un ovino, un porcino o un roedor.

10 En diversas realizaciones adicionales, una composición farmacéutica que comprende nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio que comprenden ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico; o nanopartículas que contienen cerio, que son nanopartículas de óxido de cerio preparadas en presencia de ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico; se administra a un sujeto humano o no humano, tal como otro mamífero, que incluye, pero sin limitarse a, un canino, un felino, un bovino, un equino, un ovino, un porcino o un roedor.

15 En otras realizaciones, el sujeto de administración es un animal tal como un pájaro, insecto, reptil, anfibio o cualquier animal de compañía o agrícola. Alternativamente, el sujeto de administración puede ser una bacteria, levadura, moho, hongo u otro organismo unicelular. El sujeto de administración puede ser además una planta.

20 En otra realización particular, un proceso de prevención (es decir, tratamiento profiláctico) de un evento, enfermedad o patología celular relacionada con el estrés oxidativo, comprende administrar antes del inicio de un evento, enfermedad o patología celular, una cantidad eficaz de una nanopartícula que contiene cerio, que es una nanopartícula de óxido de cerio y ácido etilendiaminodisuccínico, que comprende además ácido cítrico; o una nanopartícula que contiene cerio, que es una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico, preparada además en presencia de ácido cítrico.

25 En otra realización particular, un proceso de tratamiento de un evento, enfermedad o patología celular relacionado con el estrés oxidativo, comprende administrar después de la aparición de un evento, enfermedad o patología celular, una cantidad eficaz de una nanopartícula que contiene cerio, que es una nanopartícula de óxido de cerio que comprende ácido etilendiaminodisuccínico; que comprende además ácido cítrico; o una nanopartícula que contiene cerio, que es una nanopartícula de óxido de cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico, preparada además en presencia de ácido cítrico.

30 En diversas realizaciones, una nanopartícula que contiene cerio, tal como nanocería, de la invención tal como se define en las reivindicaciones se administra in vivo a un sujeto mediante procedimientos tópicos, entéricos o parenterales, que incluyen inyecciones, infusiones o implantes. Más en particular, se contempla específicamente administrar partículas de nanocería de la invención por cualquiera de las siguientes rutas: auricular (ótica), bucal, conjuntival, cutánea, dental, electroosmosis, endocervical, endosinusal, endotraqueal, enteral, epidural, extraamniótico, extracorpóreo, hemodiálisis, infiltración, intersticial, intraabdominal, intraamniótico, intraarterial, intrabiliar, intrabronquial, intrabursal, intracardiaco, intracartilaginoso, intracaudal, intracavernoso, intracavitario, intracerebral, intracisternal, intracorneal, intracoronario, intracornal cavernoso intracorporus, intradérmica, intradiscal, intraductal, intraduodenal, intradural, intraepidérmica, intraesofágica, intragástrica, intragingival, intraileal, intralesional, intraluminal, intralinfática, intramedular, intrameningeal, intramuscular, intraocular, intraovario, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrasinal, intraespinal, intrasinovial, intratendinoso, intratesticular, intratecal, intratorácico, intratubular, intratumoral, intratimpánico, intrauterino, intravascular, intravenoso, bolo intravenoso, goteo intravenoso, intraventricular, intravesical, intravítreo, iontoforesis, irrigación, laríngeo, nasal, nasogástrico, técnica de vendaje oclusivo, oftálmico, oftalmológico orofaríngeo, parenteral, percutáneo, periarticular, peridural, perineural, periodontal, rectal, respiratorio (inhalación), retrobulbar, tejido blando, subaracnoideo, subconjuntival, subcutáneo, sublingual, submucosal, tópico, transdérmico, transmamario, transmucoso, transplacentario, transplacentario, transplacentario, transplacentario, transplacentario, transplacentario, ureteral, uretral, vaginal y cualquier otra ruta no asignada.

35 40 45 50 55 En diversas realizaciones, los eventos y/o enfermedades relacionados con el estrés oxidativo específicamente contemplados para la prevención y/o el tratamiento incluyen, entre otros, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxia, ataxia de Friedreich, autismo, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, migraña, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral traumática, cáncer, inflamación, trastornos autoinmunitarios, lupus, esclerosis múltiple (EM), enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, estenosis, restenosis, aterosclerosis, síndrome metabólico, disfunción endotelial, vasoespasmos, diabetes, envejecimiento, fatiga crónica, enfermedad coronaria, fibrosis cardíaca, infarto de miocardio, hipertensión, angina, angina de Prinzmetal, isquemia, angioplastia, hipoxia, enfermedad de Keshan, deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, favismo, lesión por reperfusión isquémica, reumatoide y osteoartritis, asma, pulmonar obstructiva crónica enfermedad de aria (por ejemplo, enfisema y bronquitis), alergias, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad renal crónica, injerto renal, nefritis, daño por radiación ionizante, quemaduras solares, dermatitis, melanoma, psoriasis, degeneración macular, degeneración retiniana y cataractogénesis.

- 5 En diversas realizaciones, las patologías celulares relacionadas con el estrés oxidativo específicamente contempladas para la prevención y/o el tratamiento incluyen, pero no se limitan a, disfunción mitocondrial, disfunción de lisosomas y proteasomas, oxidación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y ADN), nitración de tirosina, pérdida de cascadas de señalización mediadas por fosforilación, iniciación de apoptosis, peroxidación lipídica y destrucción de ambientes de lípidos de membrana.
- 10 En otras realizaciones, las nanopartículas que contienen cerio, de la invención como se define en las reivindicaciones, se retienen en o sobre la superficie de un dispositivo médico o prótesis, tal como una cánula, catéter o endoprótesis vascular, reduciendo de este modo la inflamación localmente o sistémicamente, ya sea a corto o largo plazo.
- 15 En diversas realizaciones, las nanopartículas que contienen cerio, de la invención como se definen en las reivindicaciones, se administran en cualquier forma adecuada conocida en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a, una suspensión, gel, tableta, tableta con recubrimiento entérico, liposoma cargado, polvo, supositorios, infundibles, pastillas, cremas, lociones, ungüentos o inhalantes.
- 20 En diversas realizaciones, las nanopartículas que contienen cerio, de la invención tal como se definen en las reivindicaciones, se combinan con otras sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitarse a, agua, sales, tampones, solución salina tamponada con fosfato (PBS), azúcares, albúmina de suero bovino o humano, lípidos, fármacos, colorantes, saborizantes, aglutinantes, gomas, tensioactivo, cargas o cualquier excipiente conocido en la técnica.
- 25 En una realización particular, el vehículo que comprende las nanopartículas que contienen cerio, de la invención tal como se definen en las reivindicaciones, se esteriliza antes de la administración.
- 30 En otras realizaciones, una célula o cultivo celular se pone en contacto con una nanopartícula que contiene cerio, o partículas de la invención como se definen en las reivindicaciones. El contacto puede practicarse mediante la exposición de una célula o cultivo celular mediante procedimientos *in vitro* o *ex vivo*, en los que el último procedimiento comprende reintroducir la célula o células tratadas en un sujeto, tal como el sujeto del cual se obtuvieron originalmente la célula o células. En diversas realizaciones, la célula es de naturaleza procariota o eucariota. En realizaciones particulares, las células tratadas se usan en la producción de proteínas usadas en la industria farmacéutica, generalmente conocidas como productos biológicos, tales como, pero sin limitarse a, antígenos, anticuerpos y vacunas. En otra realización, las células tratadas se usan en un proceso de fermentación.
- 35 En una aplicación alternativa de uso final, las partículas de nanocería de la invención se emplean como un componente de un reactivo de pulido químico-mecánico para pulir sustratos usados, por ejemplo, en dispositivos semiconductores, elementos cerámicos y ópticos. En realizaciones particulares, las partículas de nanocería de la invención se mezclan en un fluido magnético que cambia en viscosidad u otras propiedades del fluido tras la aplicación de un campo magnético. Algunos usos finales típicos para estos fluidos magnéticos incluyen amortiguadores, embragues, dispositivos de transferencia de calor y módulos de accionamiento, como se describe en la patente de Estados Unidos 5,525,249. En una realización particular, se contempla específicamente emplear partículas de nanocería de la invención como abrasivo en un fluido de acabado magnetorreológico (MRF) usado, por ejemplo, en una operación de pulido de lentes, como se describe en la patente de Estados Unidos 6,955,589. En una realización particular, las dispersiones que contienen aproximadamente 20 % en peso de las partículas de nanocería de la invención se mezclan en un fluido MRF. Algunos objetivos de añadir un abrasivo ultrafino como la nanocería de la invención a un fluido MRF son una mayor velocidad de eliminación de material, una mayor suavidad de la superficie con menos defectos físicos, una mejor estabilidad química (por ejemplo, oxidación reducida de partículas magnéticas) y una mejor estabilidad física (por ejemplo, reducción de sedimentación) del fluido MRF.
- 40 En una realización particular de la invención, se proporciona un conjugado que comprende (1) una nanopartícula que comprende cerio y ácido etilendiaminodisuccínico, que opcionalmente comprende además ácido cítrico; o una nanopartícula que contiene cerio preparada en presencia de ácido etilendiaminodisuccínico, opcionalmente preparada adicionalmente en presencia de ácido cítrico; y (2) un agente biológicamente activo. En realizaciones particulares, el agente biológicamente activo comprende material de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, ácido desoxirribonucleico de plásmido, ácido ribonucleico de interferencia pequeño (ARNip), ácido micro ribonucleico (ARNmi) o un aptámero/ribointerruptor. En una realización particular, el conjugado descrito anteriormente se usa como un agente de transfección celular.
- 45 La invención se ilustra aún más por los siguientes ejemplos que de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención.
- 50

Sección experimental

Dispersión de nanopartículas y evaluaciones de tamaño

- 55 Se realizó una caracterización cualitativa simple de las dispersiones de partículas mediante la evaluación del grado de dispersión de Tyndell que exhiben las dispersiones cuando se iluminan con una luz de puntero de láser roja, con relación a la cantidad de dispersión de una muestra del solvente puro.

Las evaluaciones cuantitativas del tamaño de partícula de las dispersiones de nanopartículas pueden realizarse mediante varias técnicas.

- 5 Las mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS) se obtuvieron mediante el uso de un analizador de tamaño de partículas Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments Corp., Holtzville, Nueva York, Estados Unidos) equipado con una cubeta de cuarzo. Las muestras se filtraron típicamente a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras antes de la medición para eliminar contaminantes bacterianos. Los tamaños de DLS informados son el parámetro ponderado de número lognormal. Estos tamaños de partículas hidrodinámicos son típicamente más grandes que los tamaños producidos por otras técnicas porque la técnica DLS incluye contribuciones de iones o moléculas adsorbidos que constituyen la esfera de solvatación de la partícula.
- 10 Alternativamente, la estimación del tamaño de partícula por análisis de ancho de pico de los espectros de difracción de rayos X (XRD) se realiza mediante el uso del procedimiento de Scherrer. La preparación de la muestra para las mediciones de XDR se realiza de la siguiente manera: las muestras líquidas se mezclaron ligeramente, se colocaron en un bote Telfon, se dejaron secar bajo una lámpara de calor durante varias horas (hasta que estuvieron casi secas), el líquido concentrado resultante se colocó sobre un disco de cuarzo de señal de fondo cero, se dejó secar bajo la
- 15 lámpara de calor, y después se secó en un horno a temperatura ambiente o a aproximadamente 80 °C durante cuatro horas bajo una atmósfera de nitrógeno seco. El disco recubierto se analizó después por XRD mediante el uso de una adherencia de celda seca de gas nitrógeno. Los espectros de XRD se registraron en un difractómetro Rigaku D2000 equipado con ánodo rotatorio de cobre, monocromador de grafito de haz de difracción sintonizado con la radiación de cobre K-alfa y un detector de centelleo.
- 20 Alternativamente, el tamaño de las nanopartículas podría determinarse mediante análisis directo de imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las partículas.

Prueba de actividad de catalasa

- 25 La capacidad de las dispersiones acuosas de nanopartículas que contienen cerio de catalizar la eliminación del peróxido de hidrógeno se determinó mediante el uso de un kit de ensayo de catalasa roja Amplex® (A22180) adquirido de Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, Estados Unidos. La actividad de tipo catalasa se midió en muestras de concentración de 60 µM incubadas durante 1 hora, cada muestra se analizó por triplicado y se promediaron los resultados. La actividad en unidades de catalasa se calculó en base a una curva estándar de peróxido de hidrógeno.

Ejemplo 1

Preparación de nanocería con ácido cítrico y EDTA

- 30 A un vaso de precipitado de 0,8 L a temperatura ambiente, se añadieron 500 gramos de agua destilada, 10 gramos de nitrato de cerio hexahidratado, 2,4 gramos de ácido cítrico y 4,3 gramos de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se mezclaron y disolvieron. Después se añadió hidróxido de amonio concentrado (28-30 %) hasta que el pH de la solución fue de 8,5. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C. Posteriormente, se
- 35 añadieron 4,8 ml de peróxido de hidrógeno (50 %), y la reacción se mantuvo a 80 °C durante aproximadamente 1 hora, dando como resultado una suspensión transparente de color amarillo/naranja. La suspensión se enfrió a temperatura ambiente, y después se lavó por diafiltración para eliminar el exceso de sales a una conductividad iónica de menos de aproximadamente 10 mS/cm. El pH de la dispersión del producto final fue de aproximadamente 7,2.

Las relaciones molares entre iones cerosos/ácido cítrico/EDTA que se añadieron a la mezcla de reacción fueron 1,0/0,5/0,5, respectivamente.

- 40 La dispersión del producto final fue un líquido transparente de color naranja claro que mostró un alto grado de dispersión de Tyndall cuando se iluminó con un haz LÁSER de baja intensidad, una prueba para partículas coloidales bien dispersas. El análisis del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz indicó un diámetro hidrodinámico de 3,1 nm. Se observó que la dispersión del producto de reacción final era estable (es decir, bien dispersa) durante
- 45 varios meses. La identificación de fases mediante análisis de XRD de polvos indicó la presencia de una fase isoestructural con CeO₂ (PDF # 34-394). Se determinó que el tamaño promedio de cristalita para las partículas de nanocería era de 2,4 nanómetros a partir del análisis del ancho del pico de XRD de polvos (220) mediante el uso del procedimiento de Scherrer.

Ejemplo 2

Preparación de nanocería con EDDS

- 50 Se repitieron procedimientos de reacción acuosa similares a los usados en el Ejemplo 1, excepto que se eliminó la adición de ácido cítrico y que se añadieron 23,5 gramos de una solución al 35 % de sal trisódica de ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS) en lugar de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). De esta manera, se añadieron cantidades equimolares de iones cerosos y EDDS.

La dispersión del producto final fue un líquido en su mayor parte transparente, de color rojo/naranja oscuro que mostró un alto grado de dispersión de Tyndall cuando se iluminó con un haz LÁSER de baja intensidad. El análisis del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz indicó un diámetro hidrodinámico de 29,5 nm con una polidispersidad de 0,145.

5 **Ejemplo 3**

Preparación de nanocería con ácido cítrico y EDDS

Se repitieron procedimientos de reacción acuosa similares a los usados en el Ejemplo 1, excepto que se usó una cantidad equimolar de sal trisódica de ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS) en lugar de sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

10 Las relaciones molares entre iones cerosos, ácido cítrico y EDDS fueron 1,0/0,5/0,5, respectivamente.

El producto de reacción final fue un líquido transparente de color naranja claro que mostró un alto grado de dispersión de Tyndall cuando se iluminó con un haz LÁSER de baja intensidad, una prueba para partículas coloidales bien dispersas. El análisis del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz indicó un diámetro hidrodinámico de 2,7 nm con una polidispersidad de 0,147.

15 Se observó que la dispersión del producto de reacción final era estable (es decir, bien disperso) durante al menos 18 meses.

La identificación de fases mediante análisis de XRD de polvos indicó la presencia de una fase isoestructural con CeO₂ (PDF # 34-394). Se determinó que el tamaño promedio de cristalita para las partículas de nanocería era de 2,1 nanómetros a partir del análisis del ancho del pico de XRD de polvos (220) mediante el uso del procedimiento de Scherrer.

20

Se evaluó la actividad de tipo catalasa para cada una de las dispersiones de productos de nanopartículas preparadas en los Ejemplos 1-3 mediante el uso de la Prueba de actividad de catalasa descrita anteriormente.

Ejemplo	Estabilizadores	Actividad de Catalasa (mU/ml)
1	CA/EDTA	630
2	EDDS	350
3	CA/EDDS	1.010

Los resultados se proporcionan en la tabla anterior.

25 El examen de los resultados mostrados en la tabla anterior indica que ambas dispersiones de nanopartículas preparadas con EDDS tienen una actividad de tipo catalasa. En particular, la dispersión de nanopartículas preparada en el Ejemplo 3 con ácido cítrico y EDDS mostró la mayor cantidad de actividad de tipo catalasa.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una dispersión de nanopartículas, que comprende:
 - a. formar una mezcla de reacción que comprende ion ceroso, ácido etilendiaminodisuccínico, un oxidante, ácido cítrico y agua; y
 - b. formar en la mezcla de reacción una dispersión de nanopartículas de óxido de cerio.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además calentar o enfriar la mezcla de reacción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 100 °C.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende peróxido de hidrógeno.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas nanopartículas de óxido de cerio están sustancialmente no aglomeradas.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas nanopartículas de óxido de cerio se **caracterizan por** un diámetro hidrodinámico menor que aproximadamente 30 nanómetros.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas nanopartículas de óxido de cerio se **caracterizan por** un diámetro hidrodinámico menor que aproximadamente 5 nanómetros.
7. Una composición farmacéutica que comprende nanopartículas de óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.
8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente para prevenir una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo o un evento relacionado con el estrés oxidativo.
9. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente para prevenir una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo o un evento relacionado con el estrés oxidativo, que comprende: administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.
10. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente para prevenir una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo o un evento relacionado con el estrés oxidativo.
11. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un síntoma de una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo o de un evento relacionado con el estrés oxidativo, que comprende: administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico.
12. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de óxido de cerio, ácido cítrico y ácido etilendiaminodisuccínico para su uso en el tratamiento de un síntoma de una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo o de un evento relacionado con el estrés oxidativo en un paciente.
13. Una dispersión de nanopartículas de óxido de cerio preparadas por el procedimiento de la reivindicación 1.