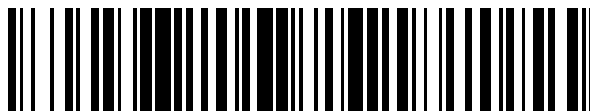


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 056**

21 Número de solicitud: 201600210

51 Int. Cl.:

A61K 9/54 (2006.01)

A61K 33/44 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

16.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2016

Fecha de la concesión:

10.01.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.01.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (50.0%)
Pabellón de Gobierno, Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES y
UNIVERSIDAD DE VIGO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ FANARRAGA, Mónica;
CORREA DUARTE, Miguel Ángel;
PÉREZ LORENZO, Moisés y
GONZÁLEZ DOMÍNGUEZ, Elena**

54 Título: **Cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje de dispositivos nano y micrométricos con actividad terapéutica**

57 Resumen:

Cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje de dispositivos nano y micrométricos con actividad terapéutica.

La presente invención se refiere a una cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje a la membrana celular y de transporte hacia el citosol de dispositivos micro-nanométricos con actividad terapéutica. Asimismo se contempla una composición que comprende a) un dispositivo micro-nanométrico con actividad terapéutica, y b) una cobertura de nanotubos de carbono que recubre al dispositivo micro-nanométrico. Finalmente se contempla dicha composición para su empleo en terapias antineoplásicas y terapias dirigidas a alteraciones del sistema nervioso.

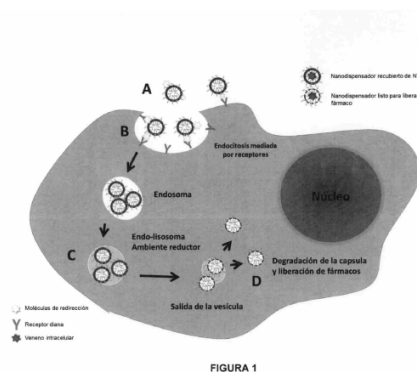


FIGURA 1

ES 2 577 056 B2

DESCRIPCIÓN

Cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje de dispositivos nano y micrométricos con actividad terapéutica.

Objeto de la invención

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, en concreto, se refiere al empleo de coberturas de nanotubos de carbono como sistemas de anclaje a la membrana celular y de transporte hacia el citosol de dispositivos nano y micrométricos con actividad terapéutica. En particular se contempla su aplicación en terapias neoplásicas y en terapias dirigidas a alteraciones del sistema nervioso.

Antecedentes de la invención

El Cáncer es una enfermedad altamente heterogénea donde algunas células que se dividen rápidamente escapan a todos los mecanismos de control genético, resultando en innumerables mutaciones aleatorias (*Navin et al. "Tumor evolution inferred by single cell sequencing", Nature 2011, 472, 90-94*). Algunos de estas mutaciones son incompatibles con la supervivencia celular, pero otras proporcionan ventajas genéticas sustanciales que inevitablemente conducen a una resistencia a diferentes fármacos. Como resultado, las terapias dirigidas a genes o proteínas son sólo efectivas de forma transitoria hasta que surgen nuevas adaptaciones o mutaciones celulares que eluden el efecto del fármaco. Por esta razón, la resistencia genética a la quimioterapia es uno de los problemas a los que se enfrenta la farmacología a medio plazo.

Como resultado de la resistencia, cada vez hay que emplear mayores dosis de fármacos para garantizar la eliminación de las células mas resistentes del tumor. Estas dosis altas muchas veces son inviables debido a su toxicidad.

Por ejemplo, el paclitaxel (taxol®) favorece la estabilización de los microtúbulos y provoca la muerte de las células que se dividen activamente como las células del cáncer. Pero, a pesar de ser uno de los agentes antitumorales más empleados en las últimas décadas, el paclitaxel tiene numerosas desventajas, como su insolubilidad en disolventes salinos. A nivel sistémico todos estos fármacos tienen además innumerables inconvenientes pues son inhibidores de la proliferación de todas las células del organismo, lo cual tiene importantes efectos secundarios en el paciente que es tratado.

En la aplicación dirigida de terapias, el empleo de nano-dispensadores dirigidos permitiría que, por ejemplo, fármacos que no son solubles en disolventes fisiológicos debido a su hidrofobicidad, llegasen intactos a su zona de aplicación. En este sentido, la nanotecnología proporciona alternativas completamente novedosas.

En otras áreas terapéuticas, como las enfermedades neurodegenerativas, el fracaso clínico de muchos candidatos farmacológicos es a menudo atribuible a los métodos de entrega (*delivery*) que no atraviesan, por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE). En el caso del cerebro, se restringe la difusión pasiva de muchos fármacos, lo que constituye un obstáculo importante en el tratamiento farmacológico del sistema nervioso central (SNC). Por tanto, los métodos que puedan mejorar la administración de fármacos al cerebro y al sistema nervioso son de gran interés farmacéutico.

Existen varios sistemas de terapia que utilizan métodos no invasivos, incluyendo la manipulación de drogas que abarca la transformación en análogos lipófilos, los pro-fármacos, la administración química de fármacos, la administración de fármacos mediada por vectores de entrega receptor o mediada por fármacos y administración de fármacos por vía intranasal, que explota las vías neuronales olfativas y del trigémino para administrar drogas al cerebro.

Por otro lado, también se emplean métodos invasivos como la administración de fármacos intracraneal directa por intra-cerebro-ventricular, intracerebral o administración intratecal después de crear aberturas reversibles en la cabeza. Todos estos métodos conllevan un riesgo biológico importante de modo que, actualmente, se contemplan otro tipo de tratamientos, como las terapias dirigidas, para conseguir que dichas terapias puedan acceder a nivel transcraneal al cerebro, o a las células del sistema nervioso periférico. Algunos de estos mecanismos se basan en la endocitosis mediada por receptores.

Algunos patógenos, como virus y ciertas bacterias, entran en el sistema nervioso central logrando el paso físico directo a través de células endoteliales o neuronales para infectar el cerebro empleando receptores. También existen toxinas que preferentemente interactúan con tipos específicos de células para ejercer una amplia gama de efectos biológicos en las neuronas periféricas y centrales. Los mecanismos de interacción de estos microorganismos o de las toxinas con las células del sistema nervioso se pueden utilizar para diseñar terapias que puedan entrar en el sistema nervioso a modo de ligandos, generando innumerables diseños de nanovehículos.

Los nanofilamentos en general, y los nanotubos de carbono (NTCs) en particular, son muy estables químicamente. Como todos los nanomateriales disponen de una relación superficie/peso extraordinaria (aproximadamente 1000-2000 m² por gramo de material).

Los NTCs representan una clase de materiales altamente versátiles que muestran propiedades mecánicas, térmicas y electrónicas muy interesantes. Los NTCs son capaces de atravesar tejidos y penetrar en el interior de las células por diferentes mecanismos, fundamentalmente por endocitosis (*Shi et al. "Cell entry of one dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation", Nature Nanotechnology 2011, 6, 714-719; Lacerda et al. "Translocation mechanisms of chemically functionalised carbon nanotubes across plasma membranes", Biomaterials 2012, 33, 3334-3343*). La entrada de los NTCs en la célula depende de las moléculas que lleven adheridas a su superficie (funcionalización).

Los NTCs al entrar en contacto con sistemas biológicos se recubren (es decir, se funcionalizan) con los componentes de éstos, constituyendo la llamada "biocorona" (*Saptarshi et al. "Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle", Journal of Nanobiotechnology 2013, 11, 26*). Esta biocorona proporciona a los NTCs propiedades biomiméticas y hace que las células los capturen activamente hacia su interior vía receptores de membrana (*Kostarelos et al. "Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type", Nature Nanotechnology 2007, 2 108-113*). Existen muchos trabajos que muestran como la cubierta proteica puede modificarse para dirigir los NTCs a dianas específicas y así conseguir redireccionar estos nanomateriales hacia células diana, por ejemplo que exhiban ligandos que interaccionen con las células del cáncer. Esta invención aprovecha

estas propiedades de los NTCs para el diseño de nuevos nano-dispositivos de terapia dirigida y acción intracelular.

La funcionalización de los nanofilamentos con proteínas permite modificar las propiedades físicas de la superficie de estos nanomateriales, como son la solubilidad y dispersabilidad, fundamentales para que puedan ejercer sus propiedades biológicas, permitiéndoles tener una mejor interacción con los receptores (moléculas biológicas) de las membranas de las células del cáncer (ES2478793B2).

Ante la necesidad existente de terapias dirigidas alternativas, los autores de la presente invención, tras un importante trabajo de experimentación, han desarrollado una nueva composición de NTCs a modo de recubrimiento: una cobertura de NTCs en forma de corona para facilitar la entrada de micro y nanodispositivos al interior de las células.

Dentro de esta aplicación, en el estado de la técnica existe además gran interés por los sistemas de liberación de fármacos encapsulados en nanopartículas que protejan los fármacos de la degradación y que, combinados con métodos físicos, incrementen de forma significativa la penetración del fármaco en las células diana (por ejemplo, en el tumor), actuando como vehículos del mismo (*Stephania Fleury Taveira and Renata Fonseca Vianna Lopez (2011). Topical Administration of Anticancer. Drugs for Skin Cancer Treatment. Skin Cancers - Risk Factors, Prevention and Therapy, Prof. Caterina La Porta (Ed.), ISBN: 978-953-307-722-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/skincancers-risk-factors-prevention-and-therapy/topical-administration-of-anticancer-drugs-for-skin-cancertreatment>*).

La composición de la presente invención, supone un importante avance en el estado de la técnica, ya que, a diferencia de lo divulgado hasta el momento, los NTCs actúan por sus propiedades como anclaje de micro y nanocapsulas en la superficie celular, favoreciendo posteriormente la salida de estos dispositivos desde el endo-lisosoma y/o fago-lisosoma al interior celular, donde se produciría la liberación progresiva de diferentes terapias como fármacos o ácidos nucleicos, por ejemplo de ARN de interferencia.

La composición de la invención presenta por tanto importantes aplicaciones clínicas, pudiéndose emplear en el tratamiento adyuvante o neo-adyuvante de muchos tipos de cánceres o tumores, a través de diferentes vías de aplicación, así como en terapias dirigidas a otras patologías, como las del sistema nervioso.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Diagrama de mecanismo de entrada y liberación intracelular de los dispositivos modelo rodeados de la cobertura de NTCs.

Figura 2.- Imagen del nanodispositivo modelo recubierto de la cobertura de NTCs con microscopia electrónica de transmisión (izda.) y de barrido (dcha.).

Figura 3.- Imagen de microscopia electrónica de barrido que muestra la interacción de la cobertura de NTCs con la superficie celular.

Figura 4.- Imagen del nanodispositivo liberado a nivel citosólico. **Izquierda:** Imágenes de microscopia confocal tomada en un plano Z de las células donde se muestra cómo los

nanodispositivos están localizados en el citoplasma celular a la altura del núcleo.
Derecha: medida del diámetro de los nanodispositivos intracelularmente

Figura 5.- Imagen del nanodispositivo liberado a nivel citosólico fuera de las vesículas endolisosomales. **a)** localización de los lisosomas de las células mediante tinción específica (acridina naranja). **b)** localización de los nanodispositivos en el citoplasma.

Figura 6.- Imagen de células HeLa tratadas con nanodispositivos que liberan la terapia (colorante) tras su sometimiento a las condiciones reductoras de los endo-lisosomas.

Descripción de la invención

En base a las necesidades de la técnica en relación con la búsqueda de terapias dirigidas alternativas, los autores de la presente invención han desarrollado una composición formada por un dispositivo micro-nanométrico con actividad terapéutica, rodeado por una cobertura de nanotubos de carbono que lo recubre.

En esta composición, la cobertura de nanotubos de carbono actúa como sistema de anclaje a la membrana celular y de transporte hacia el citosol del dispositivo con actividad terapéutica.

De esta forma, estos sistemas de terapia están dirigidos por los NTCs que, funcionalizados con ligandos determinados, son capaces de introducir las terapias en determinadas células de forma selectiva, y así lograr altas concentraciones de fármacos, agentes de contraste de imagen, bioterapias u otros a nivel intracelular, proporcionando una mejora del rendimiento terapéutico a nivel local y disminuyendo los efectos secundarios no deseados.

Los nanotubos de carbono que forman la cobertura pueden ser tanto multipared como de una sola pared, y pueden tener un diámetro desde 1 a 100 nm y una longitud desde cientos de nanómetros a micras.

La funcionalización de los NTCs puede llevarse a cabo con ligandos, en particular proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos o pequeñas moléculas, que se unen a receptores celulares de cualquier naturaleza, permitiendo direccionar los micro-nanodispositivos a las células diana. En realizaciones preferidas de la composición de la presente invención, los NTCs se funcionalizan con proteínas. En particular, la funcionalización se puede llevar a cabo con suero, lo que permite modificar las propiedades físicas de la superficie de estos nanomateriales, como son la solubilidad y dispersabilidad, que son fundamentales para que puedan ejercer sus propiedades biológicas, permitiéndoles tener una mejor interacción con los receptores (moléculas biológicas) de las membranas de las células del cáncer.

Estas proteínas hacen que las células reconozcan específicamente a los nanotubos de la cobertura de la micro-nanoestructura como algo propio, endocitándolos activamente, de forma que, una vez en el citosol celular, puedan actuar de numerosas formas. Si los nanotubos se encuentran libres (no unidos al dispositivo terapéutico) interfirieren con los procesos dinámicos de los microtúbulos formando haces. Cuando esto ocurre, las células en división que precisan de una dinámica microtubular muy activa se quedan bloqueadas en metafase y terminan por morir.

Asimismo, es posible funcionalizar los NTCs recubriéndolos con otro tipo de proteínas o péptidos, por ejemplo las proteínas de interacción de tipo microbiológico que emplean algunos patógenos, como virus y ciertas bacterias, que facilitan la entrada al sistema nervioso central, o ciertas toxinas que preferentemente interactúan con tipos específicos de células para ejercer una amplia gama de efectos biológicos en las neuronas periféricas y centrales. Los mecanismos de interacción de estos microorganismos o de las toxinas con las células del sistema nervioso se pueden utilizar para diseñar terapias que puedan entrar en el sistema nervioso a modo de ligandos, permitiendo el diseño de nanovehículos "a la carta".

Los dispositivos con actividad terapéutica empleados en la composición de la invención presentan dimensiones, que van desde el rango de los nanómetros hasta incluso el de las micras, siendo útiles en la administración de composiciones para el tratamiento de tumores y otras patologías.

Los micro y nanodispositivos pueden estar compuestos por micro-nanopartículas huecas o sólidas recubiertas, total o parcialmente, por los nanotubos de carbono. Las huecas pueden incluir en su interior diferentes terapias, como fármacos o ácidos nucleicos tipo DNA. o RNA, para su posterior liberación. Las sólidas podrían ser de diversas naturalezas con potencial terapéutico, por ejemplo nanopartículas que se calienten por efectos de radiaciones infrarrojas, campos magnéticos, nanopartículas con efectos biocidas, etc.

La cobertura de nanotubos de carbono (NTCs) se puede unir al dispositivo micro-nanométrico por medio de:

- i) enlaces covalentes.
- ii) polímeros biodegradables.
- iii) enlaces sensibles a procesos de reducción en el lisosoma, o
- iv) enlaces sensibles a la acción de las enzimas del lisosoma, las llamadas hidrolasas ácidas. Estas enzimas sólo están activadas en el lisosoma y en los compartimentos membranosos de las rutas degradativas intracelulares.

En aquellas realizaciones en las que la cobertura de nanotubos se une al dispositivo micro- nanométrico por medio de enlaces covalentes (i), los nanotubos a su vez pueden llevar anclados fármacos y/o ligandos a sus paredes mediante enlaces sensibles a procesos de reducción (S-S, puentes disulfuro) o enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas del lisosoma (enlaces amida o enlaces peptídicos). La ruptura de los enlaces sensibles a los procesos de reducción (S-S) ocurre en los caminos de entrada de la célula (endosomas-endolisosomas).

En base a la cobertura de nanotubos, y a su empleo como anclaje del dispositivo micro-nanométrico a la membrana celular, los autores de la invención han desarrollado composiciones con aplicaciones diferentes:

Cobertura de NTCs para el anclaje y entrada de dispositivos micro-nanométricos con actividad terapéutica en células diana.

En esta realización particular de la composición de la invención, la cobertura de nanotubos está establemente fijada a la superficie del dispositivo micro o nanométrico mediante enlaces covalentes. Dichos enlaces covalentes se llevan a cabo a través de una aminación (por ejemplo mediante el uso de aminopropil trimetoxisilano, APS) de la superficie de los dispositivos micro-nanométricos combinada con una reacción de Steglich o método carbodiimida. De esta forma, la unión se realiza mediante el enlace entre el grupo NH_2 del nanodispensador y el grupo COOH de los NTCs.

Alternativamente, también se pueden utilizar métodos de *click chemistry* para el anclaje de los NTCs a los dispositivos micro-nanométricos (en particular la cicloadición catalizada por cobre entre azidas y alquinos, CuAAC). La *click chemistry* se define como una herramienta química para generar sustancias de forma rápida y fiable al unir pequeñas unidades entre sí, y que inspirada en la naturaleza no responde a una reacción específica.

La naturaleza de estos enlaces covalentes permite que los NTCs no se desprendan a la entrada en el citosol celular.

En esta realización de la composición de la invención, la cobertura de NTCs rodea por completo al dispositivo micro-nanométrico actuando así como sistema de anclaje a la membrana celular, y facilitando a su vez la liberación de la droga en el citosol de las células diana.

Cobertura de NTCs cara el anclaje, entrada y liberación intravesicular/citoplásmica de terapias en células diana en base a condiciones reductoras.

En esta realización particular de la composición de la invención, los NTCs de la cobertura, además de estar fijados a la superficie de los dispositivos micro-nanométricos mediante enlaces covalentes, llevan unidos, mediante enlaces sensibles a los procesos de reducción en el lisosoma o enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas del lisosoma, terapias (fármacos y/o ligandos) que se liberaran a nivel intracelular.

Las terapias y/o ligandos se anclan a las paredes de los NTCs mediante estos enlaces sensibles a procesos de reducción intracelular, como son los puentes disulfuro (S-S), p.ej. mediante el uso de cistamina, creando así este enlace sobre la cobertura de NTCs, aunque también se contemplan otras estrategias basadas en la química orgánica, o mediante enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas del lisosoma, facilitando su liberación.

Cobertura de NTCs para el anclaje, entrada y liberación intracelular de NTCs cara terapia citotóxica.

En esta realización particular de la composición de la invención, los dispositivos micro-nanométricos pueden estar anclados a los NTCs mediante:

- a) polímeros biodegradables, o
- b) enlaces que son sensibles a procesos de reducción en el lisosoma o enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas del lisosoma.

En la opción a), los NTCs se fijan al dispositivo micro-nanométrico mediante el empleo de polímeros biodegradables, como son los polielectrolitos cargados biodegradables, que liberan los nanotubos de forma dirigida y controlada al degradarse (por ejemplo, dextrano sulfato de sodio o clorhidrato de poli-L-arginina). A su vez, la cobertura de NTCs recubre, total o parcialmente, al dispositivo como sistema de anclaje a la membrana celular, facilitando además la liberación de la droga contenida en el dispositivo en el citosol.

En la opción b) los NTCs se fijan al dispositivo micro-nanométrico mediante enlaces que se rompen en medio reductor, como puedan ser los puentes disulfuro (ej. cistamina), o enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas del lisosoma, provocando la liberación de los NTCs. Igualmente, la cobertura de NTCs sirve como sistema de anclaje a la membrana celular y permite la liberación de la terapia en el citosol. En este caso, los dispositivos, que llevan unido a su superficie la cobertura de NTCs, por acción de los enzimas y el pH intracelular, liberaran su recubrimiento de NTCs entre 48-72 h aproximadamente desde la llegada a nivel intracelular, para que los NTCs efectúen su acción antiproliferativa.

En ambos casos, la acción terapéutica derivaría de la combinación del efecto antiproliferativo de los NTCs y de los agentes neoplásicos contenidos en los nanodispensadores, al ser ambos liberados.

La composición de la invención presenta importantes aplicaciones clínicas, pudiéndose emplear en terapias antineoplásicas, en el tratamiento adyuvante o neo-adyuvante de muchos tipos de cánceres o tumores, a través de diferentes vías de aplicación, así como en terapias dirigidas a otras patologías, como las del sistema nervioso, las del sistema respiratorio, las del sistema digestivo y, en general, a cualquier tejido u órgano.

Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención de partículas de SiO₂@dye@NTCs:

Síntesis de los dispositivos nanométricos: Partículas de SiO₂

(i) Esferas de sílice: siguiendo el método Stober, una solución de TEOS:EtOH:H₂O:NH₄OH (1,7:18,2:3,1:1,97 mL) se agitó vigorosamente durante 2 h para obtener una suspensión turbia blanca. Las esferas monodispersas (- 500 nm) se lavaron con etanol mediante 3 ciclos de redispersión/centrifugación (9000 rpm, 10 min), y finalmente se volvieron a dispersar en 25 mL de agua. La concentración final fue de 0,0174 g/mL.

(ii) Marcaje con colorante de las partículas de sílice: las partículas de sílice se recubrieron con APS mediante la dilución de 87 mg de SiO₂ en 10 mL de EtOH y la adición de 0,5 mL de APS. Después de agitar 3 h, el exceso se eliminó mediante 3 ciclos de redispersión/centrifugación (7000 rpm, 20 min). Después de esto, las partículas de SiO₂ funcionalizadas con APS se diluyeron en 10 mL de EtOH y se añadieron a 10 mL de una disolución de isotiocianato de rodamina B (0,32 mg/mL). Después de agitar 3 h, el exceso se eliminó mediante 3 ciclos de redispersión/centrifugación (7000 rpm, 20 min). La concentración final fue de 8,7 mg/mL.

(iii) Recubrimiento de las partículas de SiO₂: 10 mL de esferas de SiO₂ preparadas previamente (8,7 mg/mL), se diluyeron con agua hasta 20 mL y se añadieron a 60 mL de una disolución de cloruro de polidialildimetilamina (PDDA) (1 mg/mL que contenía NaCl

0,5 M) bajo sonicación débil. La reacción transcurrió durante 1 h para permitir la adsorción del PDDA y, a continuación, su exceso se eliminó con 3 ciclos de redispersión/centrifugación (8000 rpm, 20 min). El sulfonato de poliestireno (PSS) (1 mg/mL que contiene NaCl 0,5 M) fue depositado sobre las esferas de SiO₂ recubiertas de una manera similar y usando las mismas condiciones. La concentración final fue de 8,7 mg/mL.

Revestimiento de las esferas de sílice con NTCs

Los NTCs se pre-trataron con acetona y etanol para eliminar los materiales orgánicos, congelados con N₂ y se liofilizaron. Después de esto, los nanotubos de carbono se oxidaron mediante el siguiente procedimiento: 100 mg de NTCs se sometieron a ultrasonidos en 100 mL de una mezcla de H₂SO₄/HNO₃ (3:1) con un sonicador de punta durante 15 min y con un baño de ultrasonidos durante 4 h. Después, la muestra se lavó con una disolución acuosa de NaOH diluido con 3 ciclos de redispersión/centrifugación (9000 rpm, 10 min). Cuando el pH se estabilizó en 10, la muestra se sometió a ultrasonidos con el sonicador de punta durante 2 h. Finalmente, los NTCs se dispersaron en agua, obteniéndose una dispersión estable de NTCs oxidados presentando fundamentalmente grupos carboxílicos e hidroxílicos en las paredes, los cuales les aportan una carga superficial negativa. La concentración final fue de 0,8 mg/mL.

Se diluyeron 10 mL de esferas de SiO₂ funcionalizadas previamente con PSS/PDDA (8,7 mg/mL) con 100 mL de agua milliQ. Posteriormente, se añadieron 2 mL de una disolución 0,5 M NaCl y 5 mL de una dispersión de NTCs (0,8 mg/mL). Tras un periodo de adsorción de 15 h se eliminó el exceso de NTCs mediante 3 ciclos de centrifugación/redispersión (7000 rpm, 20 min). La concentración final fue de 3,8 mg/mL. En la Figura 1 se puede observar la cobertura de NTCs alrededor de las partículas escogidas como modelos de nanodispensador, así como la trayectoria de entrada de los dispositivos con actividad terapéutica hasta liberar su terapia.

Funcionalización de la cobertura de NTCs

La funcionalización se llevó a cabo con proteínas séricas diluidas en una solución salina, como por ejemplo el medio de cultivo celular, a una concentración de 20-30 mg/mL mediante sonicación moderada en baño con punta durante 2 min.

Ejemplo 2. Cobertura de NTCs para el anclaje y entrada de nanodispensadores de terapias en células diana.

Se prepararon los nanodispensadores con un contenido terapéutico en base a cualquiera de las soluciones técnicas que existen en patentes o en la literatura. Se recubrieron con los NTCs tal y como se indica en el ejemplo anterior, uniendo los nanotubos bien mediante fuerzas electrostáticas (usando polielectrolitos cargados) o mediante enlaces covalentes (e.g., entre el grupo carboxílico de los nanotubos oxidados y el grupo amino con el que se funcionalizó el nanodispensador). Se funcionalizaron con proteínas séricas o con ligandos destinados a su unión con dianas moleculares de la superficie de las células cancerosas (Scott et al. "Antibody therapy of cancer", *Nature Reviews Cancer* 2012, 12, 278-287).

Se empleó la línea celular HeLa como objeto del estudio y se sometió a una solución de 5 µg/mL de los nanodispensadores funcionalizados con proteínas de suero como se

indica en el ejemplo anterior. El tratamiento duró 96 h. Durante el tratamiento las células se observaron *in vivo* y también se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con tritón X100 al 1% en PBS y se tiñeron con Hoechst 33342 para su observación mediante microscopía de alta resolución. El resultado de este estudio mostró cómo el recubrimiento corona de NTCs en estas estructuras favorece la internalización (Figura 2 y 3) y liberación intracelular citosólica de estas nanoestructuras (Figura 4) en modelos celulares.

Ejemplo 3. Cobertura de NTCs para el anclaje, entrada y liberación intravesicular/citoplásmica de terapias en células diana en base a condiciones reductoras.

Se prepararon los nanodispensadores (en este caso sirve cualquier estructura nanométrica donde se puedan anclar NTCs) en base a cualquiera de las soluciones técnicas que existen en patentes o en la bibliografía. Se recubrieron y se funcionalizaron, tal y como se indica en el ejemplo 1. En este caso los NTCs fueron anclados de forma estable, bien mediante fuerzas electrostáticas (usando polielectrolitos cargados) o mediante enlaces covalentes (e.g., entre el grupo carboxílico de los nanotubos oxidados y el grupo amino con el que se funcionalizó el nanodispensador) a las estructuras nanométricas. A su vez, a la superficie externa de los NTCs se acopló una terapia mediante un enlace disulfuro, en este caso un colorante solamente detectable una vez liberado del nanotubo. Dicha terapia se liberó a nivel intracelular debido a la ruptura de dicho enlace una vez los nanodispensadores pasaron por los lisosomas. Los nanodispositivos eventualmente escapan del lisosoma al citosol (Figura 5). En la Figura 6 se muestra una prueba de concepto donde se observan células mostrando tinción con un colorante tras su liberación del anclaje a los nanotubos de carbono.

Ejemplo 4. Cobertura de NTCs para el anclaje, entrada y liberación intracelular de NTCs para terapia citotóxica.

Se prepararon los nanodispensadores (en este caso sirve cualquier estructura nanométrica donde se puedan anclar los NTCs) en base a cualquiera de las soluciones técnicas que existen en patentes o en la bibliografía. Éstos se recubrieron, tal y como se indica en el ejemplo 1, con polielectrolitos bio-degradables (dextrano sulfato de sodio como polielectrolito cargado positivamente y poli-L hidrocloreuro de arginina como polielectrolito cargado negativamente) y posteriormente se recubrieron con los NTCs. Los NTCs que se emplearon en el recubrimiento tenían una longitud de 500-5000 nm y tras 48-72 h se liberaron por la degradación de los polímeros que actúan como anclaje a la nanoestructura. Su liberación les permitió interactuar con los componentes celulares de forma biomimética y producir un efecto antiproliferativo, citotóxico.

REIVINDICACIONES

1. Cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje a la membrana celular y de transporte hacia el citosol de dispositivos micro-nanométricos con actividad terapéutica.
2. Composición que comprende:
 - a) un dispositivo micro-nanométrico con actividad terapéutica, y
 - b) una cobertura de nanotubos de carbono que recubre al dispositivo micro-nanométrico.
3. Composición, según la reivindicación 2, donde los nanotubos de carbono están funcionalizados con ligandos.
4. Composición según la reivindicación 3, donde los nanotubos de carbono están funcionalizados con proteínas, péptidos, ácidos nucleicos u oligosacáridos.
5. Composición según la reivindicación 4, donde las proteínas son proteínas de interacción de tipo microbiológico de patógenos o toxinas.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 2-5 donde la cobertura de nanotubos de carbono se une al dispositivo micro-nanométrico por medio de:
 - i) enlaces covalentes,
 - ii) polímeros biodegradables,
 - iii) enlaces sensibles a procesos de reducción en el lisosoma, o
 - iv) enlaces sensibles a la acción de enzimas de los lisosomas.
7. Composición, según la reivindicación 6, donde la cobertura de nanotubos se une al dispositivo micro-nanométrico por medio de enlaces covalentes (i).
8. Composición, según la reivindicación 7, donde los nanotubos a su vez pueden llevar anclados fármacos y/o ligandos a sus paredes mediante enlaces sensibles a procesos de reducción en el lisosoma o enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas de los lisosomas.
9. Composición, según la reivindicación 6, donde los polímeros biodegradables se seleccionan de entre dextrano sulfato de sodio y clorhidrato de poli-L-arginina.
10. Composición según la reivindicación 6 donde los enlaces sensibles a procesos de reducción empleados son puentes disulfuro.
11. Composición según la reivindicación 6 donde los enlaces cuya ruptura sea catalizada por enzimas de los lisosomas son enlaces peptídicos o enlaces amida.

12. Composición, según las reivindicaciones 2-11, para su empleo en terapias antineoplásicas.

5 13. Composición, según las reivindicaciones 2-11, para su empleo en terapias dirigidas a alteraciones del sistema nervioso.

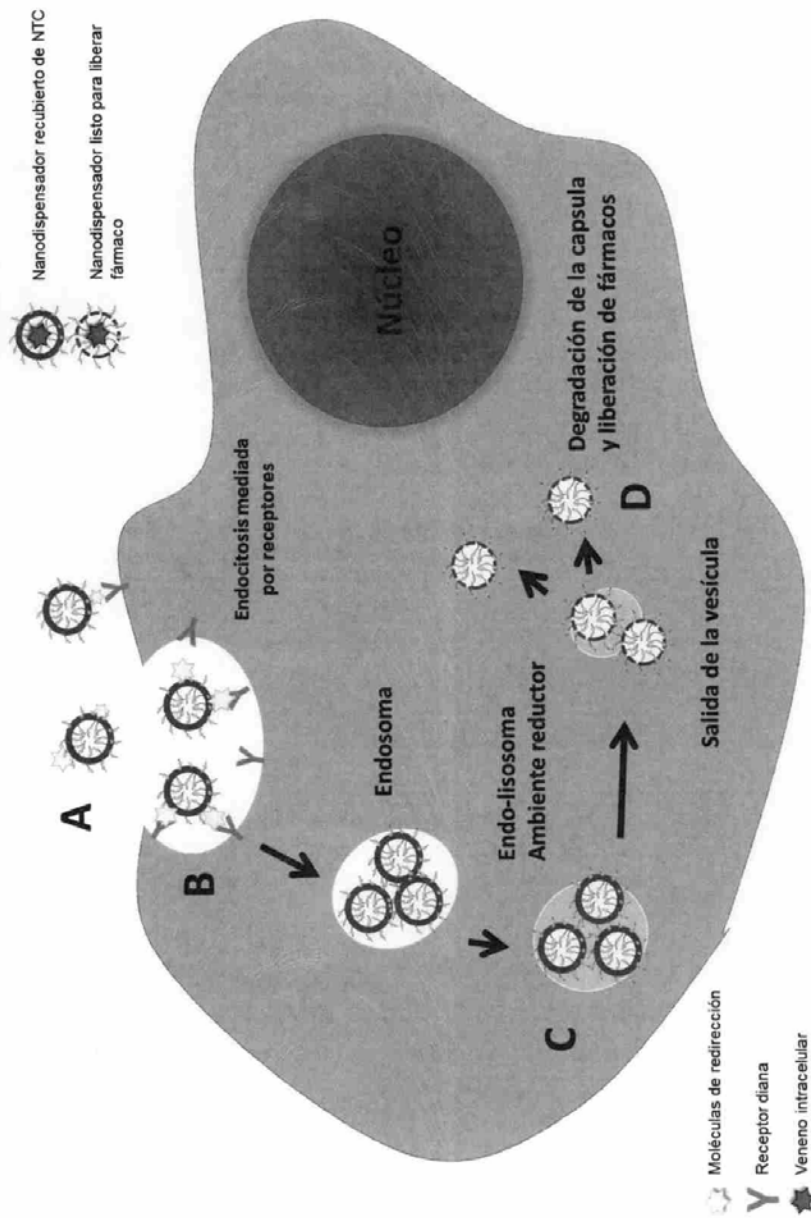


FIGURA 1

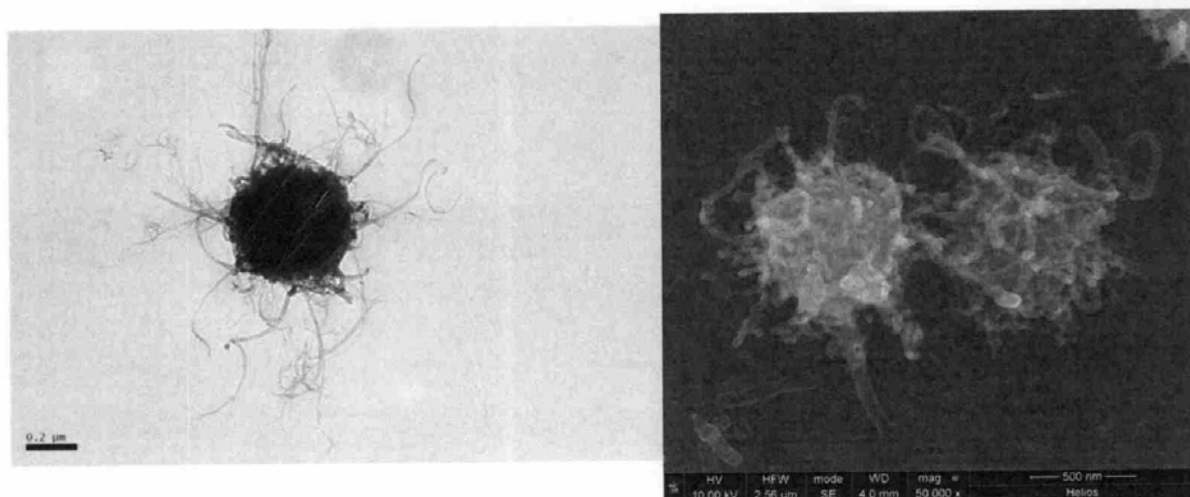


FIGURA 2

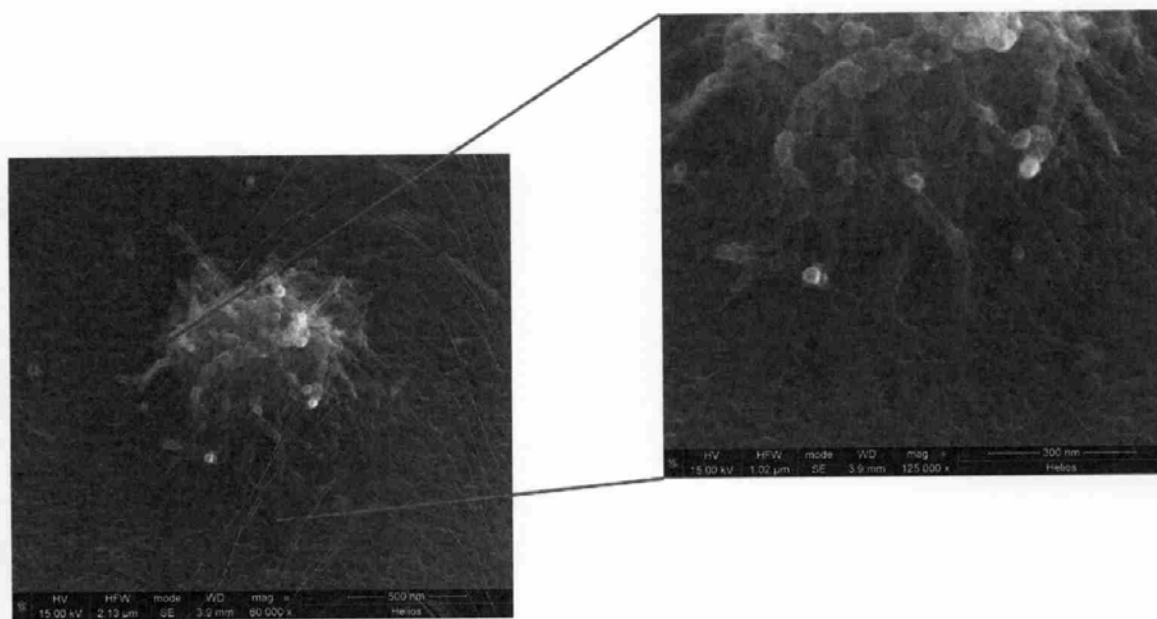


FIGURA 3

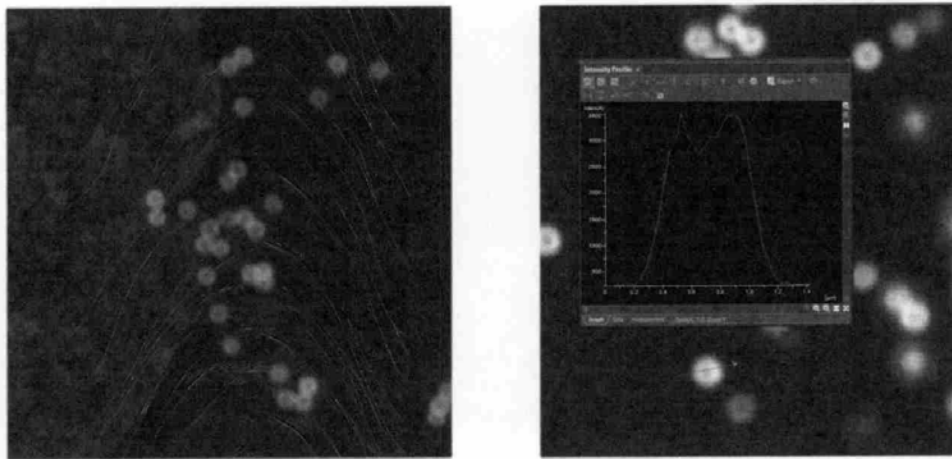


FIGURA 4

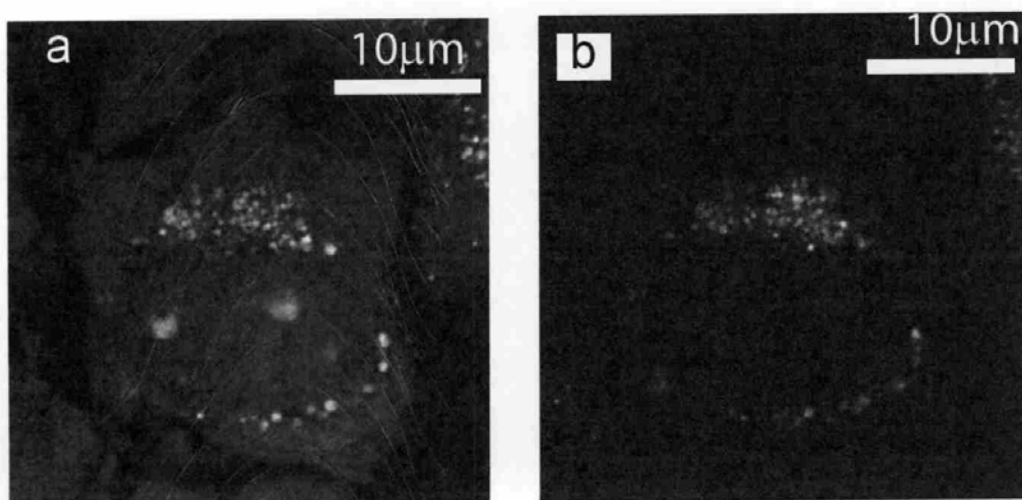


FIGURA 5

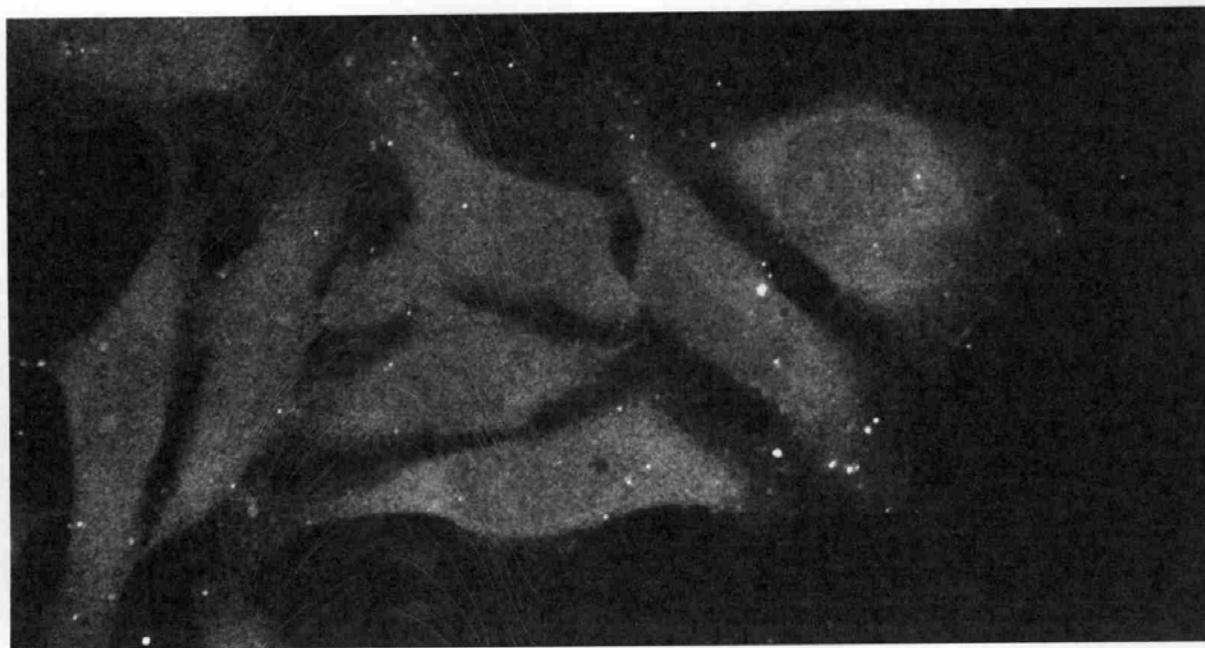


FIGURA 6



- ②① N.º solicitud: 201600210
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.03.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2478793 A1 (UNIVERSIDAD DE CANTABRIA) 22.07.2014, página 6, líneas 8-41.	1-13
A	WO 2006052538 A2 (BOSTON SCIENTIFIC SCIMED, INC. [US/US]) 18.05.2006, página 3, línea 17 – página 4, línea 28; figuras 1-6.	1-13
A	US 20030180491 A1 (HIRSCH et al.) 25.09.2003, resumen; página 10, párrafo [0153] – página 11, párrafo [0172]; figuras 1,8.	1-13
A	WO 2015127332 A1 (MOLECULAR REBAR DESIGN, LLC. [US/US]) 27.08.2015, página 3, párrafos [0008]-[0012].	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.07.2016

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/54 (2006.01)

A61K33/44 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.07.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2478793 A1	22.07.2014
D02	WO 2006052538 A2	18.05.2006
D03	US 20030180491 A1	25.09.2003
D04	WO 2015127332 A1	27.08.2015

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga una cobertura de nanotubos de carbono para su empleo como sistema de anclaje a la membrana celular y de transporte hacia el citosol de dispositivos micro-nanométricos con actividad terapéutica (reivindicación 1). También se refiere a una composición que contiene un dispositivo micro-nanométrico con actividad terapéutica junto con una cobertura de nanotubos de carbono que lo recubre (reivindicaciones 2-11) asimismo, contempla el uso de dicha composición en terapias antineoplásicas y/o terapias dirigidas a alteraciones del sistema nervioso (reivindicaciones 12 y 13).

El documento D01 divulga una composición que contiene nanofilamentos, funcionalizados con suero procedente de sangre humana, junto con al menos un excipiente. Se refiere también al procedimiento de obtención de dicha composición y a su uso para tratamiento antitumoral (ver página 6, líneas 8-41).

El documento D02 divulga un método de incorporación de nanotubos de carbono a un producto de aplicación médica, recubriendo un producto con una solución que contiene un agente bioactivo y un precursor de nanotubos de carbono. Se refiere también a un dispositivo médico formado por un núcleo cuya superficie está cubierta de una diversidad de nanotubos de carbono (ver página 3, línea 17 - página 4, línea 28; Figs. 1-6).

El documento D03 divulga unas composiciones y unos métodos de administración de fármacos a mamíferos. Dichas composiciones pueden contener: (i) vesículas con un fullereno sustituido donde el agente terapéutico se encuentra en el interior o entre capas de la pared de la vesícula, (ii) un fullereno sustituido, que comprende un núcleo de fullereno y un resto funcional, en el que el agente terapéutico está asociado al fullereno sustituido, o (iii) nanotubos de carbono a los que va unido el fármaco covalentemente (ver resumen; página 10, párrafo [0153] - página 11, párrafo [0172]; Figs. 1, 8).

El documento D04 divulga una composición que contiene una pluralidad de nanotubos de carbono funcionalizados, con paredes interna y externa formando una cavidad que permite la carga de un fármaco a liberar en un lugar específico del organismo (ver página 3, párrafos [0008] - [0012]).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-13**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa una composición que contiene nanofilamentos, funcionalizados con suero procedente de sangre humana, junto con al menos un excipiente, así como su procedimiento de obtención y su uso para tratamiento antitumoral.

La diferencia principal entre D01 y la composición reivindicada en la presente invención radica en la disposición de los nanotubos en forma de cobertura de un dispositivo micro-nanométrico con actividad terapéutica, lo que no ha sido encontrado en el estado de la técnica, ofreciendo la composición reivindicada una alternativa diferente a lo ya divulgado.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-13 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Los documentos D02-D04, aunque también anticipan composiciones que contienen nanotubos unidos a productos terapéuticos, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con la novedad y actividad inventiva de la invención.