

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 900**

51 Int. Cl.:

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2019** **E 19156311 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024** **EP 3549580**

54 Título: **Nanovehículos de direccionamiento al retículo endoplasmático**

30 Prioridad:

04.04.2018 US 201862652502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2024

73 Titular/es:

NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY (100.0%)
1 University Road
Tainan, TW

72 Inventor/es:

SHIEH, CHI-CHANG;
YEN, CHIA-LIANG;
SHIEH, DAR-BIN y
JIANG, SI-TSE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 987 900 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

Nanovehículos de direccionamiento al retículo endoplasmático

5 Antecedentes

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una enfermedad de inmunodeficiencia primaria provocada por defectos en la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 2 (NOX2, por sus siglas en inglés) en los leucocitos. Véase, por ejemplo, Holland 2013, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 27:89-99; O'Neill *et al.* 2015, *Redox Biol.* 6:135-156; y Roos 2016, *Br. Med. Bull.* 118:50-63 (Roos). NOX2 está compuesta por subunidades unidas a membrana gp91^{phox} y p22^{phox}, así como componentes citosólicos p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y la GTPasa pequeña Rac1/2. Véase Roos. Los pacientes con EGC que portan una mutación en un gen que codifica una de las proteínas componentes de NOX2 son susceptibles de padecer diversas infecciones y determinadas enfermedades autoinmunitarias debido a la falta de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) mediada por NOX2 por parte de los leucocitos activados. Véase Huang *et al.* 2016, *Inflamm. Bowel Dis.* 22:2794-280.; Huang *et al.* 2015, *Antioxid. Redox Signal.* 23:973-984; y Nguyen *et al.* 2017, *Front. Cell Infect. Microbiol.* 7:373.

Se ha identificado un paciente con EGC con una mutación puntual en el gen *Cybb*, que codifica gp91^{phox}. Véase Lin *et al.* 2002, *Biochim. Biophys. Acta* 1586:275-286 (Lin). El gen *Cybb* mutado *Cybb*^{C1024T} produce una proteína gp91^{phox} mutante que contiene un único cambio de aminoácido, designada como H338Y-gp91^{phox}. H338Y-gp91^{phox} existe en una forma inmadura que queda retenida en el retículo endoplasmático (RE) y posteriormente es degradada por la maquinaria de control de calidad de proteínas en el RE. Véase *Id.*

Se ha demostrado previamente que un inhibidor de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA), en concreto, tapsigargina, rescata la retención en el RE de H338Y-gp91^{phox} en los leucocitos de EGC y restablece la función de los leucocitos. Véase Huang *et al.* 2009, *Free Radical Biol. Med.* 47:932-940. Se ha demostrado que la curcumina, también un inhibidor de la SERCA, corrige parcialmente la retención aberrante de proteínas en el RE en la fibrosis quística. Véase Egan *et al.* 2004, *Science* 304:600-602. No obstante, la curcumina tiene efectos secundarios citotóxicos que incluyen estrés en el RE y apoptosis. Véase Gupta *et al.* 2013, *Mol. Nutr. Food Res.* 57:1510-1528; Liu *et al.*, 2016, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016:7831282; y Reuter *et al.* 2008, *Biochemical Pharmacology* 76:1340-1351.

La Solicitud de patente internacional WO03/049717 divulga el uso de inhibidores de la ATPasa de calcio del RE tales como tapsigargina, curcumina, ácido ciclopiazónico para tratar trastornos del RE.

Existe la necesidad de desarrollar composiciones farmacéuticas y métodos para tratar enfermedades de retención en el RE que tengan mayor eficacia y menos efectos secundarios.

Sumario

Para satisfacer la necesidad analizada anteriormente, se divulga un método para tratar una enfermedad provocada por la retención de proteínas en el retículo endoplasmático. El método se realiza obteniendo un inhibidor de la bomba de ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) encapsulado en una nanopartícula polimérica y administrando una cantidad eficaz del inhibidor a un sujeto que padece la enfermedad.

La nanopartícula polimérica se modifica en la superficie de manera que se dirige al retículo endoplasmático (RE). Además, la cantidad eficaz del inhibidor reduce la retención de proteínas en el RE y la encapsulación reduce los efectos secundarios del inhibidor, por ejemplo, la citotoxicidad, en comparación con administrar el inhibidor sin encapsulación.

También se divulga una composición farmacéutica que puede usarse para realizar el método anterior. La composición farmacéutica contiene un inhibidor de la bomba de SERCA encapsulado en una nanopartícula polimérica y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se ha mencionado anteriormente, la nanopartícula polimérica se modifica en la superficie de manera que se dirige al retículo endoplasmático.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

60 Breve descripción de los dibujos

La descripción a continuación se refiere a los dibujos adjuntos, de los que:

la Fig. 1A es un gráfico de barras que muestra la relación entre las formas glicosilada y subglicosilada de gp91^{phox} en ratones transgénicos *Cybb*^{C1024T} sobre un fondo *Cybb*^{-/-} ("ratones TG") determinado mediante análisis por transferencia Western de neutrófilos aislados de ratones sin tratar (-), ratones tratados con curcumina libre o

tratados con las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina indicadas (n = 4; *: p < 0,05);

la Fig. 1B, es un gráfico de barras que muestra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en neutrófilos aislados de ratones TG tratados con curcumina libre o con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina de direccionamiento al RE (n = 4; **: p < 0,01);

la Fig. 1C es un gráfico de barras que muestra la carga bacteriana como unidades formadoras de colonias (UFC) en ratones TG sin tratar (-) y tratados como se indica. (n = 4; *: p < 0,05; **: p < 0,01);

la Fig. 2 es un gráfico de barras que cuantifica la colocación a lo largo del tiempo al RE de nanopartículas de PLGA de curcumina de direccionamiento al RE, en comparación con las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina no dirigidas (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001);

la Fig. 3 es un gráfico de barras que muestra el flujo de calcio en células HL60 diferenciadas tratadas como se indica, calculado como área bajo la curva (ABC) a partir de gráficos de tasas de liberación de calcio intracelular frente al tiempo (n = 4; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001);

la Fig. 4 es un gráfico de barras que muestra el flujo de calcio en células HL60 diferenciadas tratadas como se indica, calculado como área bajo la curva (ABC) a partir de gráficos de tasas de captación de calcio extracelular frente al tiempo (n = 3; *: p < 0,05);

la Fig. 5A es un gráfico de barras del potencial de membrana mitocondrial determinado con un colorante fluorescente en células HL60 diferenciadas tratadas como se indica (n = 4; *: p < 0,05; **: p < 0,01);

la Fig. 5B es un gráfico de barras del porcentaje de células positivas para anexina V determinado mediante citometría de flujo de poblaciones de células HL60 diferenciadas tratadas como se indica (n = 4; *: p < 0,05; **: p < 0,01);

la Fig. 5C muestra gráficos de barras de intensidad relativa de Bip (panel izquierdo), ERK fosforilada (panel central) y caspasa-3 escindida (panel derecho), medida a partir del análisis por transferencia Western de proteína extraída de células HL60 diferenciadas tratadas como se indica (n = 4; *: p < 0,05);

la Fig. 6A es un gráfico de barras que muestra los números de células CD71^{bajo} CD235a^{alto} como porcentaje de células sin tratar determinado mediante citometría de flujo de células hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) de sangre periférica humanas sin tratar (-) y tratadas como se indica (n = 3; *: p < 0,05; **: p < 0,01); y

la Fig. 6B es un gráfico de barras del porcentaje de células positivas para anexina V determinado mediante citometría de flujo de HSC tratadas como se indica (n = 3; **: p < 0,01; ***: p < 0,001).

Descripción detallada

Como se ha mencionado anteriormente, se divulga un método para tratar una enfermedad provocada por la retención de proteínas en el retículo endoplasmático con un inhibidor de la bomba de SERCA. El inhibidor es un compuesto polifenólico de la dieta. El compuesto puede ser, pero sin limitación, curcumina, taspigargina, ácido ciclopiazónico, 2, 5-di-terc-butilhidroquinona, gingerol, CGP37157, terc-butilhidroquinona, paxilina y saikosaponina-d. También pueden usarse combinaciones de uno o más de estos compuestos. En un método específico, el compuesto polifenólico de la dieta es curcumina.

El inhibidor de la bomba de SERCA está encapsulado en una nanopartícula polimérica. Los polímeros de ejemplo que pueden usarse para formar la nanopartícula incluyen poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(láctida), poli(aminoácidos), poli(ε-caprolactona), polialquilcianoacrilato, alginato, gelatina, lecitina-quitosano, albúmina y quitosano. También pueden usarse mezclas de estos polímeros. En un método particular, el polímero está formado por poli(ácido láctico-co-glicólico).

La nanopartícula polimérica mencionada anteriormente se modifica en la superficie para dirigirla al RE. La modificación en la superficie puede ser un péptido de direccionamiento al RE conjugado con el polímero. Uno o más péptidos de direccionamiento al RE, por ejemplo, KDEL (SEQ ID NO: 1), KKXX (SEQ ID NO: 2), o un péptido señal de recuperación/retención en el RE de tipo RXR a base de arginina, pueden conjugarse con el polímero. KDEL se usa como péptido de direccionamiento al RE en un método de ejemplo.

El inhibidor de la bomba de SERCA encapsulado en la nanopartícula polimérica se administra al sujeto que padece la enfermedad mediada por la retención en el RE en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad. La cantidad eficaz del inhibidor reduce la retención de proteínas en el RE y la encapsulación reduce los efectos secundarios del inhibidor, en comparación con administrar el inhibidor sin encapsulación. Los efectos secundarios que se reducen pueden ser citotoxicidad, por ejemplo, estrés en el RE y apoptosis.

La cantidad eficaz de inhibidor de la bomba de SERCA puede potenciar la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de los leucocitos en el sujeto y potenciar la eliminación de bacterias en el peritoneo mediado por los leucocitos.

El método que se describe en el presente documento, como se ha expuesto anteriormente, se usa para tratar una enfermedad provocada por la retención de proteínas en el retículo endoplasmático. Dichas enfermedades son enfermedad granulomatosa crónica, fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, albinismo oculocutáneo, deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo I, enfermedad de Fabry, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia congénita de sacarasa-isomaltasa, Crigler-Najjar de tipo 2, diabetes mellitus, síndrome de Laron, hipotiroidismo primario, síndrome de QT largo congénito, deficiencia de globulina fijadora de tiroxina, β-

talasemia/enfermedad de la Hb E, hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia familiar, abeta-lipoproteinemia, hipotiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, hipofibrinogenemia hereditaria, diabetes insípida nefrogénica, diabetes insípida neurohipofisaria, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de von Willebrand de tipo IIA, enfermedad de Tángier y telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT, por sus siglas en inglés) de tipo 2 con mutación de sentido erróneo de ALK1. En un método particular, la enfermedad es enfermedad granulomatosa crónica.

En otro método específico más, la enfermedad es enfermedad granulomatosa crónica, el compuesto polifenólico de la dieta es curcumina, el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico) y la modificación en la superficie incluye el péptido de direccionamiento al RE KDEL conjugado con el polímero.

Para realizar el método anterior, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica tiene los componentes mencionados anteriormente, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la composición incluye un inhibidor de la bomba de SERCA encapsulado en una nanopartícula polimérica, en donde la nanopartícula polimérica se modifica en la superficie de manera que se dirige al retículo endoplasmático.

Además, la nanopartícula polimérica está formada por uno o más de poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(lactida), poli(aminoácidos), poli(ϵ -caprolactona), polialquilcianoacrilato, alginato, gelatina, lecitina-quitosano, albúmina o quitosano. El inhibidor de la bomba de SERCA es un compuesto polifenólico de la dieta seleccionado del grupo que consiste en curcumina, tapsigargina, ácido ciclopiazónico, 2,5-di-terc-butilhidroquinona, gingerol, CGP37157, terc-butilhidroquinona, paxilina y saikosaponina-d, o una combinación de los mismos. La modificación en la superficie incluye un péptido de direccionamiento al RE conjugado con el polímero y el péptido de direccionamiento al RE es KDEL, KKXX o una señal de recuperación/retención en el RE de tipo RXR a base de arginina.

Una composición farmacéutica de ejemplo contiene curcumina encapsulada en una nanopartícula de poli(ácido láctico-co-glicólico) modificada en la superficie con KDEL junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos específicos a continuación han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitantes del resto de la divulgación en modo alguno. Sin más elaboración, se cree que un experto en la materia puede, basándose en la descripción del presente documento, utilizar la presente divulgación en toda su extensión.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de ratón transgénico con EGC

Un modelo de ratón transgénico para la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) provocada por gp91^{phox} mutante H338Y se estableció en un fondo de inactivación de *Cybb* de la siguiente manera. Se obtuvo un cromosoma artificial bacteriano (BAC, por sus siglas en inglés) que contenía el gen *Cybb* murino (número de clon RP23-210P9) del centro de recursos BACPAC del Children's Hospital Oakland Research Institute (Oakland, CA, EE. UU.). El BAC se modificó para contener el *Cybb*^{C1024T} mutante usando el kit de modificación de BAC de contraselección (Gene Bridges, GmbH). El transgén de BAC de *Cybb*^{C1024T} resultante se introdujo mediante inyección pronuclear en óvulos aislados de ratones B6.129S-*Cybb*^{tm1Din/J} mutantes dirigidos a *Cybb* (Cat. de Jackson Labs N.º 002365) usando técnicas convencionales. Los fundadores y las progenies portadoras del transgén de BAC se identificaron mediante PCR a partir del ADN de la cola y mediante secuenciación de ADN directa. La expresión de *Cybb*^{C1024T} mutante de longitud completa se confirmó mediante análisis por transferencia Western. Los ratones transgénicos se retrocruzaron adicionalmente con los ratones con inactivación de *Cybb* para generar los ratones transgénicos *Cybb*^{C1024T} en un fondo de inactivación de *Cybb*.

Se usaron ratones C57BL/6 como ratones de tipo silvestre (TS) y se adquirieron en el Centro de Animales, National Cheng Kung University (NCKU), Tainán, Taiwán. Todos los ratones se retrocruzaron de forma rutinaria con el fondo de C57BL/6 y se sometieron a un genotipado de todo el genoma para confirmar el fondo genético. Los ratones se alojaron en las instalaciones para animales del Centro de Animales de Laboratorio de la NCKU. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la NCKU.

Ejemplo 2: Análisis de ratones transgénicos con EGC

La expresión de la proteína H338Y-gp91^{phox} en neutrófilos de los ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} se examinaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western con un anticuerpo anti-gp91^{phox}. Para aislar los neutrófilos, a los ratones se les inyectaron por vía intraperitoneal 3 ml de tioglicolato al 3 % para provocar neutrófilos peritoneales. Cuatro horas más tarde, los ratones se sacrificaron y la cavidad peritoneal se lavó dos veces con 5 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS) con ácido etilenglicol tetraacético 2 mM para recoger los neutrófilos peritoneales provocados. Después, los neutrófilos peritoneales se lavaron con PBS antes de su uso.

Los resultados indicaron que los neutrófilos aislados de ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} produjeron la forma subglicosilada de H338Y-gp91^{phox}. Los niveles de la forma glicosilada de la proteína H338Y-gp91^{phox} eran significativamente inferiores en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} en comparación con ratones de tipo silvestre. Como se esperaba, no se detectó la expresión de gp91^{phox} en ratones *Cybb*^{-/-}. Estos resultados indican que se

estableció con éxito un modelo murino de EGC que porta la mutación *Cybb*^{C1024T} y que demuestra la expresión de proteína H338Y-gp91^{phox} de tráfico defectuoso que imita la observada en pacientes humanos con EGC.

Ejemplo 3: Producción de nanopartículas cargadas de curcumina

Se prepararon nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) cargadas de curcumina con un enfoque modificado de doble emulsificación (emulsión W1/O/W2; véase Zhong *et al.* 2010, *J. Nanobiotechnology* 8:6). Brevemente, la curcumina se disolvió en 500 µl de alcohol (W1) mientras se dispersó PLGA (PLA:PGA = 50:50, PM = 60.000) en diclorometano (O). Se añadió W1 al O y se mezclaron con un vibrador ultrasónico de tipo sonda para formar una primera emulsión. La primera emulsión, es decir, W1/O, se añadió a una solución acuosa (W2) de alcohol polivinílico (PVA) al 1 % y la mezcla se agitó para formar una segunda emulsión (W1/O/W2) que contenía nanopartículas de PLGA. Después, la segunda emulsión se desgasificó al vacío para retirar los disolventes orgánicos y la curcumina libre y el PVA restantes se retiraron mediante centrifugación. Se analizó la capacidad de carga promedio de las nanopartículas de PLGA midiendo la densidad óptica a 435 nm usando un NanoDrop 1000™ (NanoDrop Technologies, LLC, EE. UU.).

Ejemplo 4: Producción de nanopartículas cargadas de curcumina dirigidas al RE

Las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina producidas como se ha descrito en el párrafo anterior se conjugaron con un péptido de direccionamiento al RE de la siguiente manera. Las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina se incubaron en una solución de etildimetilaminopropil carbodiimida/N-hidroxisuccinimida durante 1 h y después se retiraron de la solución. Las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina se suspendieron en H₂O junto con un exceso molar de 10 veces del péptido de direccionamiento al RE KDEL y se incubaron durante 18 horas, después de lo cual se retiró el péptido en exceso mediante centrifugación. Las nanopartículas marcadas se redispersaron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Ejemplo 5: Tratamiento de ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} con nanopartículas cargadas de curcumina

Se sometieron a ensayo nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina con o sin el péptido KDEL de direccionamiento al RE para determinar sus efectos sobre la expresión y la maduración de proteína H338Y-gp91^{phox} en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T}. Brevemente, los ratones no se trataron o se trataron por separado con curcumina libre, nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina durante 24 horas en cantidades correspondientes a 20 mg/kg de curcumina. Se provocaron, aislaron y analizaron neutrófilos de los ratones, para determinar la expresión de proteína H338Y-gp91^{phox} como se ha descrito anteriormente.

Se realizaron análisis estadísticos con el software Prism (GraphPad Software). Los valores medios de cada grupo se presentan como media ± ETM y se comparan mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de un ensayo a posteriori de diferencia menos significativa o un ANOVA bidireccional seguido de un ensayo a posteriori de Bonferroni. En todos los experimentos, los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados mostraron que todos los ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} tratados y sin tratar expresaron la forma subglicosilada de H338Y-gp91^{phox}. Los ratones tratados con curcumina libre no mostraron ningún cambio en la cantidad de H338Y-gp91^{phox} glicosilada expresada en comparación con los ratones sin tratar. Por otro lado, los ratones tratados con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina mostraron un aumento de 1,3 veces en la expresión de H338Y-gp91^{phox} glicosilada en comparación con ratones sin tratar. Además, los ratones tratados con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina expresaron 1,7 veces más H338Y-gp91^{phox} glicosilada en comparación con ratones sin tratar. Se obtuvo un resultado similar tras analizar las relaciones de H338Y-gp91^{phox} glicosilada frente a subglicosilada en las mismas muestras. Véase la Fig. 1A.

Estos datos muestran que el suministro de curcumina al RE a través de una nanopartícula de PLGA dirigida al RE en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} facilita la maduración de la proteína H338Y-gp91^{phox} mutante en los neutrófilos.

Ejemplo 6: Producción de especies reactivas de oxígeno en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T}

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la actividad NOX2 en los neutrófilos, que es esencial para la eliminación de bacterias, se ve comprometida en pacientes con EGC como resultado del secuestro de gp91^{phox} en el RE. La función de NOX2 en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} se examinó midiendo la producción de ROS en neutrófilos de estos ratones tratados con curcumina libre o tratados con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina.

Ensayo de producción de ROS

Se provocaron neutrófilos peritoneales de ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} y se aislaron como se describió anteriormente. Los neutrófilos se lavaron con HBSS 1X y FBS al 5 % tres veces y después se incubaron con diacetato

de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína 10 μ M a 37 °C durante 30 minutos. Después, las células se incubaron con 13-acetato de miristato de forbol 100 ng/ml (Sigma) a 37 °C durante 15 min para inducir la producción de ROS. La fluorescencia en células tratadas con PMA se detectó mediante citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos se analizaron con el software Flowing Software 2. Los resultados se muestran en la Fig. 1B.

La producción de ROS por parte de los neutrófilos aislados de ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} tratados con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina fue significativamente superior a la de los aislados de animales tratados con curcumina libre. Estos datos muestran que el suministro de curcumina al RE a través de una nanopartícula de PLGA dirigida al RE en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} restablece la función de NOX2 en los neutrófilos y se correlaciona con la capacidad de la curcumina suministrada al RE para facilitar la maduración de la proteína H338Y-gp91^{phox} mutante en los neutrófilos.

Ejemplo 7: Ensayo de eliminación de bacterias en el peritoneo

La función de NOX2 también es necesaria para eliminar infecciones bacterianas. La eliminación de bacterias se examinó mediante inyección intraperitoneal de bacterias, es decir, *S. aureus*, en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} sin tratar, ratones transgénicos tratados con curcumina y ratones transgénicos tratados con curcumina encapsulada en PLGA.

Preparación de bacterias

Se cultivó *S. aureus* (N.º de ATCC 25923) durante la noche a 37 °C en una placa de agar de soja tríptico con sangre de oveja al 10 %. Se recogió una única colonia de la placa y se subcultivó en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante 16 h. El cultivo bacteriano se diluyó 1:50 con 5 ml de LB y se incubó a 37 °C durante 6 h. Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en el cultivo de *S. aureus* esparciendo una gota de 10 μ l del cultivo en una placa de TSA, incubando la placa durante la noche y contando el número de colonias.

Tratamiento de ratones con *S. aureus*

Se dejaron ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} sin tratar o se trataron durante 24 h con curcumina libre, nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 20 mg/kg como se ha expuesto anteriormente. A los ratones se les inyectaron por vía intraperitoneal 1×10^7 UFC de *S. aureus* en 100 μ l de PBS. Después de 4 h, los ratones se sacrificaron y se recogieron células peritoneales mediante lavado con 5 ml de PBS. Se determinaron las UFC de *S. aureus* en el líquido de lavado cultivando en placa una gota de 50 μ l de líquido de lavado en placas de TSA y contando las colonias de *S. aureus* que crecían después de una incubación durante la noche.

Los resultados, que se muestran en la Fig. 1C, indicaron que la carga bacteriana en ratones tratados con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina fue significativamente inferior a la de los ratones sin tratar, y también fue inferior a la de los ratones tratados con curcumina libre o con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina no dirigidas.

Siguiendo los procedimientos anteriores, se determinó que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de neutrófilos provocados por tioglicolato en exudados peritoneales aislados de ratones tratados con curcumina libre, nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina.

Estos hallazgos, tomados conjuntamente, muestran que el suministro de curcumina al RE a través de una nanopartícula de PLGA dirigida al RE en ratones *Cybb*^{-/-} transgénicos *Cybb*^{C1024T} restablece la función antibacteriana de los neutrófilos.

Ejemplo 8: Cuantificación del direccionamiento al RE de nanopartículas de PLGA

Se midió la distribución intracelular en células tratadas con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina con o sin decoración con péptido de direccionamiento al RE, mediante inmunotinción y colocalización en células HL-60 diferenciadas, que tienen muchas características de los neutrófilos.

Diferenciación de células HL-60

Se cultivaron células HL-60 a 37 °C en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %. Las células a una densidad de 3×10^5 células/ml se trataron con dimetilsulfóxido al 1,3 % (Sigma-Aldrich) para inducir la diferenciación. Después de 4 días de incubación, las células diferenciadas se recogieron y las células muertas se retiraron mediante centrifugación a través de Ficoll-Hypaque.

Determinación de la localización subcelular de las nanopartículas

Las células HL-60 diferenciadas se sembraron en portaobjetos de 8 pocillos y después se marcaron con RE-Tracker, un colorante fluorescente permeable a las células que se localiza en el RE. Después, las células marcadas se trataron con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina 10 μM o con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 10 μM . Se capturaron imágenes de fluorescencia de intervalos de tiempo mediante microscopía confocal usando longitudes de onda de excitación de 488 nm y 374 nm, longitudes de onda que estimulan la fluorescencia de la curcumina y del colorante RE-Tracker, respectivamente. El grado de colocalización del colorante RE-tracker con las nanopartículas de curcumina se calculó mediante el método de correlación de Pearson a partir de imágenes de intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

Los datos mostraron que las nanopartículas dirigidas al RE se localizaron significativamente en el RE a los 4 min de la adición a las células, en comparación con las nanopartículas no dirigidas. Véase la Fig. 2. Esta diferencia significativa en la localización aumentó durante un período de tiempo de 20 min después de la adición de las nanopartículas. Los resultados confirmaron que las nanopartículas dirigidas al RE se localizaban preferentemente en el RE en las células vivas.

Ejemplo 9: Determinación de la liberación de calcio intracelular inducida por curcumina

Los inhibidores de SERCA, tales como la curcumina, provocan un aumento en la liberación de calcio intracelular desde el RE. Se comparó la capacidad de la curcumina para inducir la liberación de calcio con la de la curcumina encapsulada en nanopartículas de PLGA.

Se sembraron células HL-60 diferenciadas en portaobjetos de 8 pocillos en medio sin calcio y se cargaron con el colorante indicador sensible al calcio intracelular Fluo-4AM. Las células se trataron con taspargina (control positivo) o se trataron con curcumina, nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 0,5, 1 o 10 μM . La intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo se midió en las células tratadas mediante microscopía confocal y se analizó usando el software ImageJ. Se representó gráficamente el cambio en la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo dividido por la intensidad de la fluorescencia basal antes de la adición de calcio ($\Delta F/F_0$) frente al tiempo.

El tratamiento de las células con curcumina libre 10 μM indujo un nivel significativamente superior de liberación de calcio a una tasa más rápida, en comparación con el tratamiento con curcumina libre 0,5 μM y 1 μM . Más específicamente, los niveles de calcio en las células 40, 50 y 60 s después del tratamiento con curcumina libre 10 μM fueron significativamente superiores a los de los mismos puntos temporales en las células tratadas con curcumina libre 0,5 μM o 1 μM . La tasa de aumento de calcio intracelular, derivada de curvas de fluorescencia frente al tiempo, también fue superior en las células tratadas con curcumina libre 10 μM , en comparación con las células tratadas con concentraciones inferiores de curcumina libre.

La liberación de calcio también se midió en células tratadas con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina y nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina. Los datos mostraron que el tratamiento de células HL-60 diferenciadas con 0,5 μM y 1 μM de cualquiera de estas nanopartículas indujo una elevación del nivel de calcio intracelular y una tasa de aumento similar a las inducidas por el tratamiento con curcumina libre 10 μM . El flujo de calcio global indicado como área bajo las curvas (ABC) se muestra en la Fig. 3.

Los resultados muestran que las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina y las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina de direccionamiento al RE a 0,5 μM fueron capaces de elevar los niveles de calcio intracelular al mismo nivel del tratamiento con taspargina. El aumento de la concentración de nanopartículas de curcumina a 10 μM no aumentó adicionalmente el nivel máximo ni la tasa de aumento del nivel de calcio intracelular en las células tratadas.

Ejemplo 10: Determinación del influjo de calcio extracelular inducido por curcumina

Se midió el influjo de calcio extracelular, que se desencadena por el agotamiento de las reservas de calcio del RE, en células tratadas con curcumina libre o tratadas con nanopartículas cargadas de curcumina de la siguiente manera.

Se pretrataron células HL-60 diferenciadas con curcumina libre (10 μM), nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina (0,5 μM) y nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina (0,5 μM) a 37 °C durante la noche. Las células se lavaron con HBSS sin calcio, se sembraron en portaobjetos de 8 pocillos recubiertos con polilisina (ibidi, Planegg, Alemania) a una densidad de 1×10^5 células/ml y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las células se marcaron con 2 μM del colorante fluorescente sensible al calcio Fluo-4 AM y 1 μM de RE-tracker a 37 °C durante 30 min. Las células marcadas se trataron con CaCl_2 1,25 mM.

Las imágenes de fluorescencia se capturaron mediante microscopía confocal cada 10 s durante 5 min después de la adición de CaCl_2 . Las intensidades de fluorescencia en estas imágenes se analizaron usando el software ImageJ. Se representó el cambio en la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo dividido por la intensidad de fluorescencia basal antes de la adición de calcio ($\Delta F/F_0$) frente al tiempo, y de ese gráfico se derivó la tasa de aumento del nivel de calcio ($\Delta F/F/s$). Se calculó el flujo de calcio global como el área bajo la curva (ABC) de una curva de $\Delta F/F/s$.

frente al tiempo. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

La adición de calcio extracelular 1,25 mM no indujo un influjo significativo de calcio en las células sin tratar. La tapsigargina, un inhibidor de SERCA utilizado como control positivo, indujo el influjo de calcio 10 s después de la adición.

La curcumina libre a 10 μM indujo un influjo precoz de calcio extracelular similar al inducido por la tapsigargina. Por el contrario, la entrada de calcio extracelular inducida por nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina 0,5 μM y nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 0,5 μM sólo se detectó 60 segundos después del tratamiento con estas nanopartículas.

La medición de las tasas de aumento de intensidad de fluorescencia reveló que el tratamiento de las células con curcumina libre indujo un influjo de calcio más significativo en un punto temporal anterior, en comparación con las nanopartículas cargadas de curcumina. En particular, la tasa de influjo de calcio 20 s después del tratamiento con 10 μM de curcumina libre fue significativamente superior a la de las células tratadas con 0,5 μM de nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o con 0,5 μM de las dirigidas al RE cargadas de curcumina.

El retraso en el influjo de calcio extracelular inducido por la curcumina encapsulada en nanopartículas de PLGA redujo el influjo de calcio global en comparación con el influjo de calcio extracelular inducido por la curcumina libre. Véase la Fig. 4. Este resultado fue inesperado, en vista del hecho de que la curcumina libre indujo niveles similares de agotamiento de calcio del RE en comparación con la curcumina cargada en nanopartículas de PLGA. Como se ha señalado anteriormente, el agotamiento del calcio del RE desencadena el influjo de calcio extracelular.

Ejemplo 11: Efecto de la curcumina sobre el estrés en el RE y la supervivencia celular

Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que la curcumina es citotóxica, ya que induce estrés en el RE y apoptosis. La citotoxicidad de la curcumina libre se comparó con la de la curcumina encapsulada midiendo en las células tratadas el potencial de membrana mitocondrial (una medida de citotoxicidad), marcadores apoptóticos y la expresión de proteínas relacionadas con el estrés en el RE.

Medición del potencial de membrana mitocondrial

Se trataron células HL-60 diferenciadas con curcumina libre, nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 0,5 μM o 10 μM durante 24 horas. Las células tratadas se marcaron con 250 nM del colorante indicador de potencial de membrana mitocondrial tetrametilrodamina (TMRM) a 37 °C durante 30 min. Las células marcadas con TMRM se analizaron mediante citometría de flujo y sus potenciales de membrana mitocondrial se cuantificaron usando el paquete de software Flowing Software 2.

Los resultados revelaron que las células tratadas con curcumina libre 10 μM mostraron una reducción significativa en el potencial de membrana mitocondrial en comparación con las células de control sin tratar. Véase la Fig. 5A. Por el contrario, el potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina 10 μM o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina 10 μM no fue diferente del de las células de control sin tratar y fue significativamente superior en comparación con las células tratadas con curcumina libre. Véase *Id.*

Detección de células apoptóticas

Las células tratadas como se indicó anteriormente con curcumina libre o encapsulada se lavaron con solución salina tamponada con fosfato helada y se tiñeron con ficoeritrina-anexina V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) a temperatura ambiente durante 15 min. La anexina V se une a la superficie de las células que experimentan apoptosis y la 7-AAD sólo entra y tiñe las células apoptóticas. Las células teñidas se sometieron a análisis por citometría de flujo y los resultados se analizaron usando el paquete de análisis Flowing Software 2.

Los resultados mostraron un aumento significativo en el número de células apoptóticas después del tratamiento con curcumina libre 10 μM , como se midió mediante la unión de Anexina V a la superficie celular. Véase la Fig. 5B. Las células tratadas con la misma concentración de nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina o nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina mostraron un número significativamente inferior de células apoptóticas. Véase *Id.*

Respuesta al estrés en el RE

Para determinar si la activación de la respuesta al estrés en el RE está implicada en la apoptosis inducida por curcumina, se cuantificaron los niveles de marcadores de estrés en el RE Bip y ERK fosforilada, así como el nivel de la Caspasa 3 escindida, un marcador de la apoptosis, mediante análisis por transferencia Western de células tratadas con curcumina o curcumina encapsulada 10 μM .

Brevemente, las células tratadas se lisaron en 100 µl de tampón de lisis (Triton-X100 al 1 %, NaCl 150 mM, base de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 50×cóctel de inhibidores de proteasas, pH 7,4). Las muestras lisadas se sometieron a SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas para el análisis por transferencia Western usando anticuerpos que se unen a Bip, fosfo-ERK, ERK total, caspasa 3 escindida y β-actina. La unión de estos anticuerpos se visualizó usando reactivos de quimioluminiscencia potenciados disponibles en el mercado. Las señales quimioluminiscentes se cuantificaron a partir de imágenes usando el software ImageJ.

Los datos mostraron que el tratamiento de células con curcumina libre y con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina aumentó la expresión de Bip y la fosforilación de ERK, en comparación con las células de control sin tratar. De manera inesperada, la expresión de Bip y la fosforilación de ERK en células tratadas con nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina fueron significativamente menores que en las células tratadas con curcumina libre. Véase la Fig. 5C, paneles izquierdo y central.

Las mediciones de la escisión de caspasa 3 revelaron que la curcumina encapsulada en nanopartículas de PLGA indujo una escisión significativamente menor de caspasa 3 en comparación con el tratamiento con curcumina libre. Véase la Fig. 5C, panel derecho.

En resumen, los hallazgos expuestos en los ejemplos, citados anteriormente, indican que la curcumina libre a una concentración que puede inhibir la SERCA, es decir, 10 µM, induce un influjo de calcio rápido, conduciendo al daño mitocondrial, RE y la inducción de la apoptosis. La curcumina encapsulada en nanopartículas de PLGA que tiene una actividad inhibidora de SERCA equivalente induce un flujo de calcio retardado y protege las células del daño mitocondrial, el estrés en el RE y la apoptosis.

Además, las nanopartículas de PLGA dirigidas al RE cargadas de curcumina, mediante la inhibición de SERCA, liberan satisfactoriamente H338Y-gp91^{phox} secuestrada en el RE, recuperando de este modo la función de NOX2 sin dañar excesivamente la viabilidad celular.

Ejemplo 12: Efecto de la curcumina sobre la diferenciación de eritroblastos

Se midió la diferenciación de eritroblastos en células hematopoyéticas (HSC) de sangre periférica humanas tratadas con curcumina libre o tratadas con nanopartículas cargadas de curcumina de la siguiente manera.

Se cultivaron HCS CD34⁺ humanas en medio Dulbecco modificado de Iscove que contenía suero fetal de ternera inactivado por calor al 15 %, 2 U/ml de eritropoyetina humana recombinante, 20 ng/ml de factor de células madre y 10 ng/ml de interleucina 3 (IL-3). El día 4, el medio se reemplazó con medio nuevo sin IL-3 y las HSC se cultivaron durante otros 5 días.

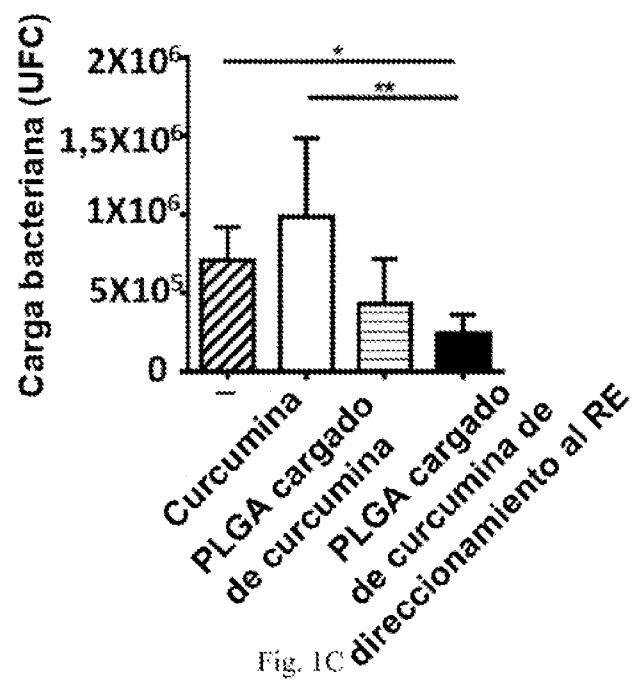
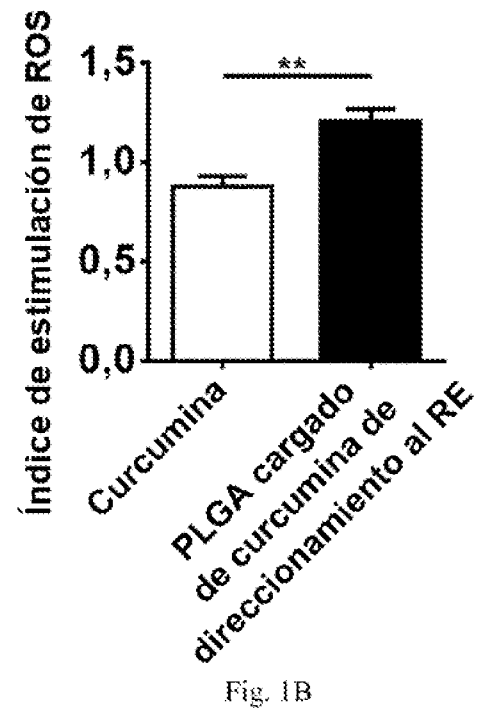
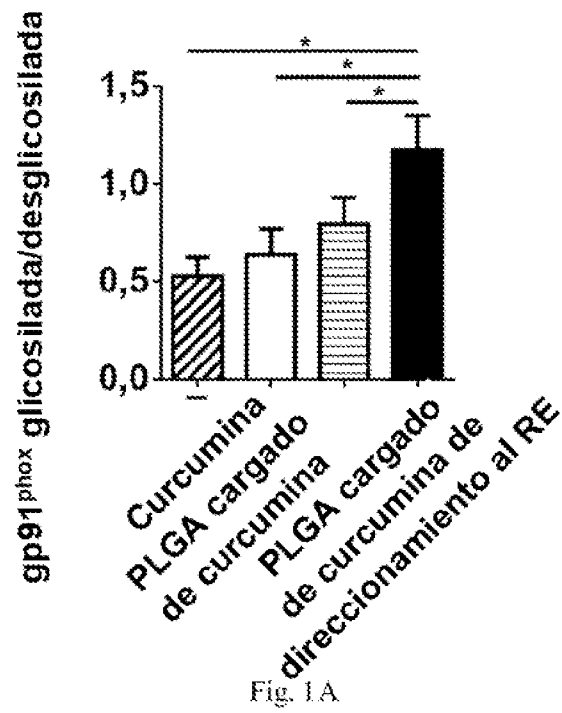
La maduración de los eritroblastos se analizó detectando la expresión en superficie de CD71 y CD235a con citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 6A. Los datos mostraron que la curcumina libre y las nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina de direccionamiento al RE potenciaron significativamente los porcentajes de más células CD71^{bajo}, CD235^{alto} maduras en HSC tratadas.

La medición de células positivas para Anexina V reveló que la curcumina encapsulada en nanopartículas de PLGA de direccionamiento al RE indujo significativamente menos apoptosis en las HSC tratadas, en comparación con el tratamiento con curcumina libre. Véase la Fig. 6B.

En resumen, el tratamiento de HSC con nanopartículas de PLGA cargadas de curcumina de direccionamiento al RE promueve la maduración de los eritroblastos y, al mismo tiempo, evita la apoptosis inducida por curcumina.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la bomba de ATPasa de calcio del retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) para su uso en el tratamiento de una enfermedad provocada por la retención de proteínas en el retículo endoplasmático, en donde el inhibidor está encapsulado en una nanopartícula polimérica que se modifica en la superficie de manera que se dirige al retículo endoplasmático (RE), y en donde la enfermedad es enfermedad granulomatosa crónica, fibrosis quística, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, albinismo oculocutáneo, deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo I, enfermedad de Fabri, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia congénita de sacarasa-isomaltasa, Crigler-Najjar de tipo 2, diabetes mellitus, síndrome de Laron, hipotiroidismo primario, síndrome de QT largo congénito, deficiencia de globulina fijadora de tiroxina, β -talasemia/enfermedad de la Hb E, hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia familiar, abeta-lipoproteinemia, hipotiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, hipofibrinogenemia hereditaria, diabetes insípida nefrogénica, diabetes insípida neurohipofisaria, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de von Willebrand de tipo IIA, enfermedad de Tángier o telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT) de tipo 2 con mutación de sentido erróneo de ALK1.
2. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un compuesto polifenólico de la dieta seleccionado del grupo que consiste en curcumina, tapsigargina, ácido ciclopiazónico, 2,5-di-terc-butilhidroquinona, gingerol, CGP37157, terc-butilhidroquinona, paxilina y saikosaponina-d, o una combinación de los mismos.
3. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(lactida), poli (aminoácidos), poli (ϵ -caprolactona), polialquilcianoacrilato, alginato, gelatina, lecitina-quitosano, albúmina o quitosano.
4. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el compuesto polifenólico de la dieta es curcumina y el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico).
5. El inhibidor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la modificación en la superficie incluye un péptido de direccionamiento al RE conjugado con el polímero y el péptido de direccionamiento al RE es KDEL (SEQ ID NO: 1), KKXX (SEQ ID NO: 2) o una señal de recuperación/retención en el RE de tipo RXR a base de arginina.
6. El inhibidor para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad es enfermedad granulomatosa crónica, el compuesto polifenólico de la dieta es curcumina, el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico) y la modificación en la superficie incluye el péptido de direccionamiento al RE KDEL (SEQ ID NO: 1) conjugado con el polímero.
7. Una composición farmacéutica, que comprende un inhibidor de la bomba de SERCA encapsulado en una nanopartícula polimérica y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la nanopartícula polimérica se modifica en la superficie de manera que se dirige al retículo endoplasmático.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde la nanopartícula polimérica está formada por uno o más de poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(lactida), poli (aminoácidos), poli (ϵ -caprolactona), polialquilcianoacrilato, alginato, gelatina, lecitina-quitosano, albúmina o quitosano y el inhibidor de la bomba de SERCA es un compuesto polifenólico de la dieta seleccionado del grupo que consiste en curcumina, tapsigargina, ácido ciclopiazónico, 2,5-di-terc-butilhidroquinona, gingerol, CGP37157, terc-butilhidroquinona, paxilina y saikosaponina-d, o una combinación de los mismos.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde el compuesto polifenólico de la dieta es curcumina y el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico).
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la modificación en la superficie incluye un péptido de direccionamiento al RE conjugado con el polímero y el péptido de direccionamiento al RE es KDEL (SEQ ID NO: 1), KKXX (SEQ ID NO: 2) o una señal de recuperación/retención en el RE de tipo RXR a base de arginina.



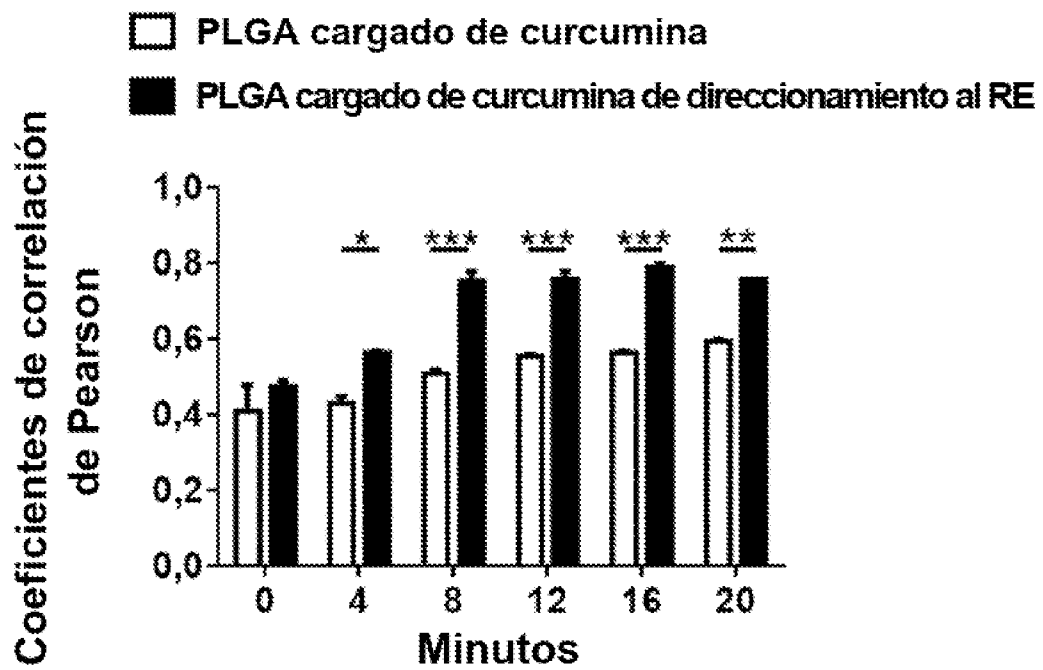


Fig. 2

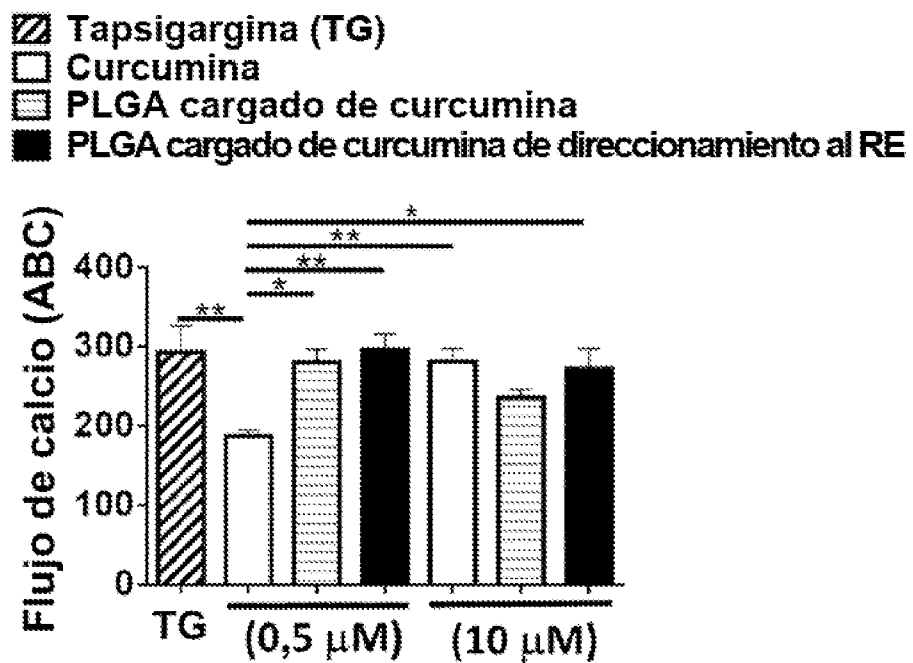


Fig. 3

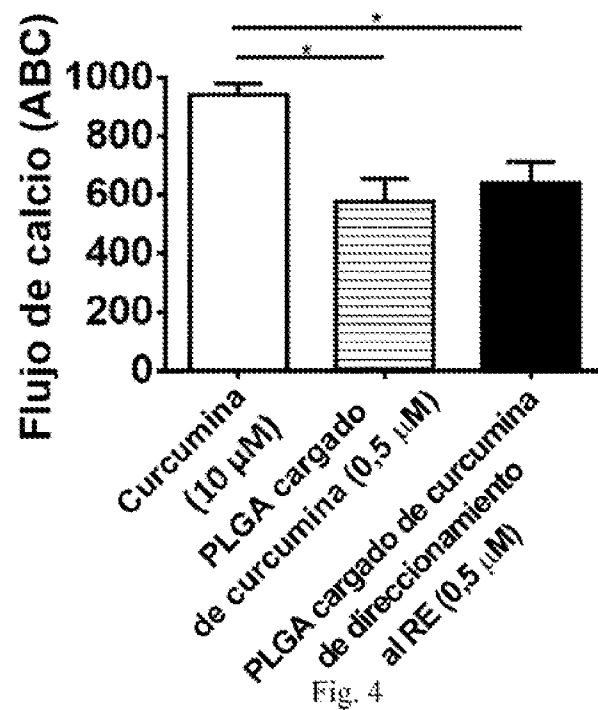


Fig. 4

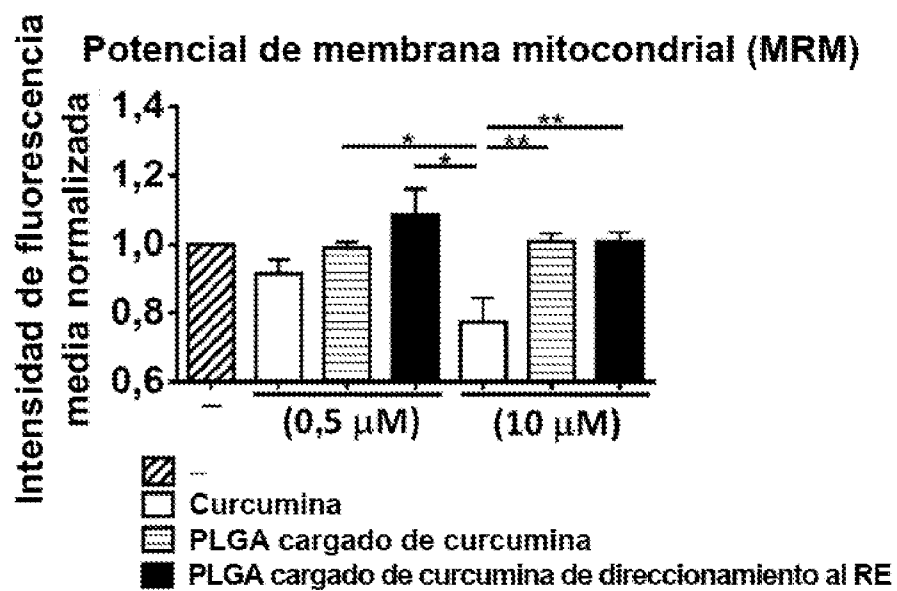


Fig. 5A

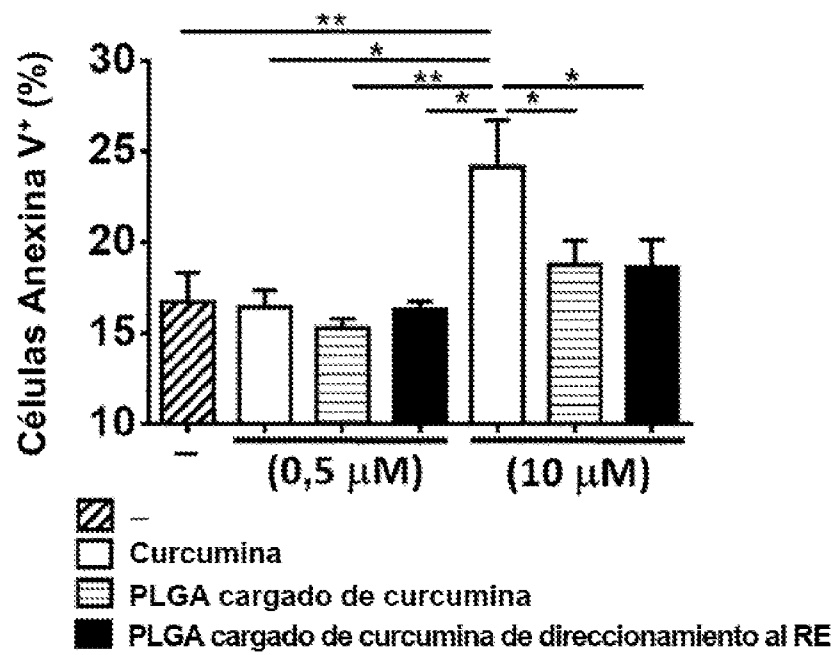


Fig. 5B

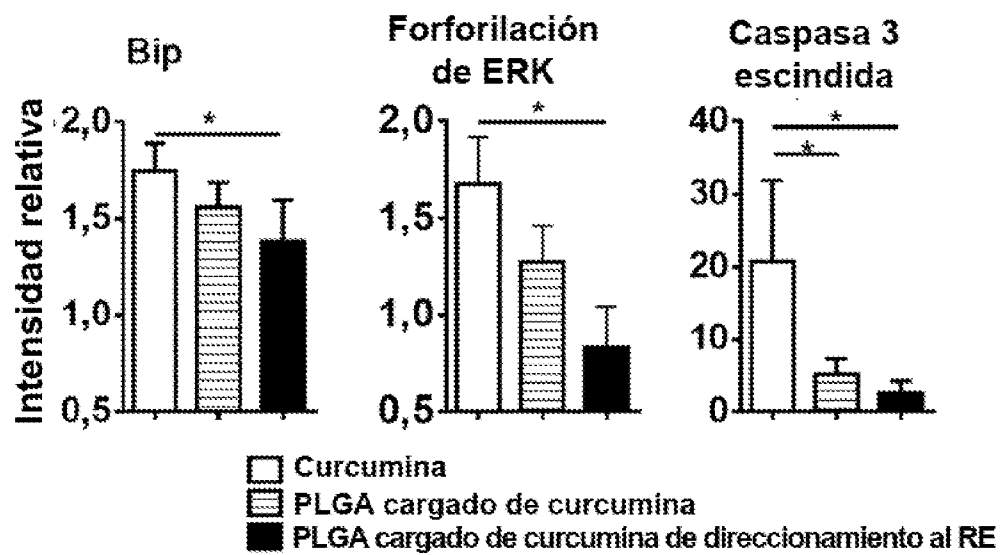


Fig. 5C

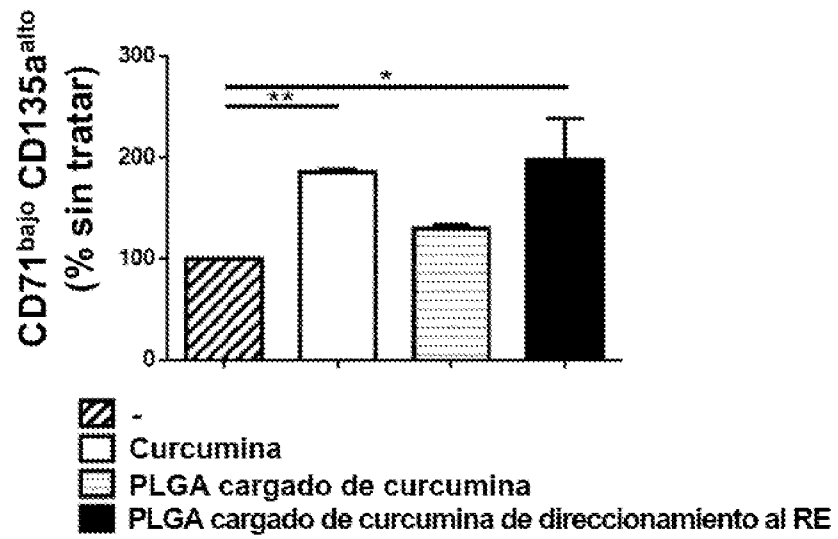


Fig. 6A

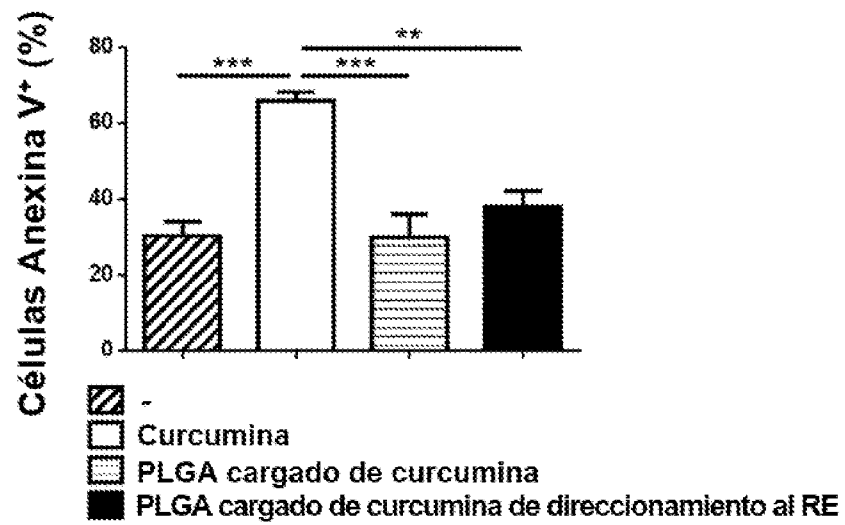


Fig. 6B