

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 645**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19	(2006.01) A61P 1/18	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01) A61P 19/02	(2006.01)
A61K 9/48	(2006.01) A61K 9/10	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) A61K 47/59	(2007.01)
A61K 9/20	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01)	
A61K 9/08	(2006.01)	
A61P 1/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2016** **PCT/US2016/058763**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17074993**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2016** **E 16794819 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3368028**

54 Título: **Composiciones de dendrímero y su uso en el tratamiento de la enterocolitis necrotizante y otros trastornos gastrointestinales**

30 Prioridad:

29.10.2015 US 201562248063 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2025

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.00%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US

72 Inventor/es:

HACKAM, DAVID;
KANNAN, SUJATHA;
RANGARAMANUJAM, KANNAN;
NINO, DIEGO, F. y
ZHANG, FAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 012 645 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

Composiciones de dendrímero y su uso en el tratamiento de la enterocolitis necrotizante y otros trastornos gastrointestinales

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica prioridad del documento U.S.S.N.. 62/248,063, presentado el 29 de octubre de 2015.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones orales de dendrímeros de poli(amidoamina) para el tratamiento y/o diagnóstico de trastornos inflamatorios, tales como la enterocolitis necrotizante.

Antecedentes de la invención

La enterocolitis necrotizante (ECN) es una enfermedad inflamatoria grave que afecta al tracto gastrointestinal de los lactantes prematuros, y se caracteriza por el desarrollo súbito de necrosis intestinal seguida de sepsis sistémica y muerte en más del 40% de los casos. En los niños que sobreviven a la aparición de la ECN, aproximadamente el 15% desarrolla lesiones neurológicas graves, que se caracterizan por un deterioro grave de la cognición. La inflamación sistémica y la neuroinflamación son las principales consecuencias conocidas asociadas a la ECN.

La enterocolitis necrotizante es una enfermedad adquirida, principalmente de neonatos prematuros o enfermos, caracterizada por necrosis de la mucosa o incluso intestinal más profunda. Es la urgencia gastrointestinal más frecuente entre los neonatos. Los síntomas y signos incluyen intolerancia a la alimentación, letargo, inestabilidad térmica, íleo, distensión abdominal, emesis biliosa, hematoquecia, sustancias reductoras en las heces, apnea y, a veces, signos de sepsis. El diagnóstico es clínico y se confirma mediante estudios de imagen. El tratamiento es principalmente de apoyo e incluye succión nasogástrica, líquidos parenterales, NPT y antibióticos. Actualmente no existe ningún enfoque terapéutico o profiláctico eficaz para la ECN y su inflamación sistémica asociada en lactantes prematuros. El tratamiento de un bebé que pueda tener enterocolis necrotizante incluye interrumpir la alimentación regular; aliviar los gases del intestino insertando una sonda en el estómago; administrar líquidos intravenosos y antibióticos; vigilar la afección con radiografías abdominales, análisis de sangre y medición de los gases sanguíneos. El bebé necesitará cirugía si hay perforación de los intestinos o inflamación de la pared abdominal (peritonitis). La cirugía se utiliza para extirpar el tejido intestinal muerto, y puede requerir una colostomía o ileostomía, así como varias semanas antes de que el intestino pueda volver a conectarse.

El documento WO 2015/038493 titulado "Synthesis of new asymmetric conjugates based on bow-tie PAMAM dendrimers for the delivery of tumor-targeted drugs", publicado el 19 de marzo de 2015.

El artículo de Teo Ian et al., Embo Molecular Medicine, (201209), vol. 4, nº 9, ISSN 1757-4684, páginas 866 – 881, titulado "Preventing acute gut wall damage in infectious diarrhoeas with glycosylated dendrimers".

El documento US 2003/180250 titulado "Compositions and complexes containing a macromolecular compound as potential anti-inflammatory agents", publicado el 25 de septiembre de 2003.

El artículo de Islam Dilara et al., Immunology (201602), vol. 147, nº 2, ISSN 1365-2567, páginas 178 - 189 titulado "Controlling the cytokine storm in severe bacterial diarrhoea with an oral Toll-like receptor 4 antagonist".

El artículo de Navath Raghavendra S et al., Bioconjugate Chemistry, (200812), vol. 19, nº 12, ISSN 1520-4812, páginas 2446 – 2455, titulado "Dendrimer-drug conjugates for tailored intracellular drug release based on glutathione levels".

El artículo de Mishra Manoj K et al., ACS Nano, (20140325), vol. 8, no. 3, ISSN 1936-086X, páginas 2134 – 2147, titulado "Dendrimer brain uptake and targeted therapy for brain injury in a large animal model of hypothermic circulatory arrest".

El artículo de Yiyun C et al., European Journal of Medicinal Chemistry, Editions Scientifique Elsevier, París, FR, vol. 40, nº 12, ISSN 0223-5234, (20051201), páginas 1390 - 1393, (20051201), titulado "Polyamidoamine dendrimers used as keloportun solubility enhancers".

El artículo de S. Sadekar et al., Advanced Drug Delivery Reviews, (20120501), vol. 64, nº 6, ISSN 0169-409X, páginas 571 – 588, titulado "Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: Implications for oral drug delivery".

El artículo de Fang Min et al., The Journal of Physical Chemistry B, (20120315), vol. 116, nº 10, ISSN 1520-5207, páginas 3075 – 3082, titulado "Host-guest chemistry of dendrimer-drug complexes: 7. Formation of stable inclusions between acetylated dendrimers and multi-charged drugs".

Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar una administración mejorada al tracto gastrointestinal.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar medios para tratar trastornos inflamatorios del tracto gastrointestinal, especialmente enterocolitis.

Sumario de la invención

La invención se define en el conjunto de las reivindicaciones adjuntas. Una composición farmacéutica que incluye dendrímeros que liberan agentes terapéuticos, profilácticos y/o de diagnóstico puede administrarse por vía oral para alcanzar células diana en el tracto gastrointestinal, para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal inflamatorio, así como en el cerebro. Como demuestra el ejemplo, la formulación fue eficaz en el tratamiento de la enterocolitis necrotizante (ECN), una enfermedad inflamatoria grave que afecta al tracto gastrointestinal de los bebés prematuros y se caracteriza por el desarrollo repentino de necrosis intestinal seguida de sepsis sistémica y muerte en más del 40% de los casos. El desarrollo de la ECN requiere la activación del receptor bacteriano receptor tipo Toll 4 (TLR4) en el epitelio intestinal, lo que conduce a la activación de las principales células inmunitarias del cerebro, la microglía. La activación de la microglía inicia una cascada inflamatoria que provoca la pérdida de mielina en el córtex prefrontal y el desarrollo de deterioro cognitivo en ratones. Es importante destacar que los cambios estructurales e inflamatorios que se observan en los ratones se asemejan mucho a los cambios observados en los seres humanos que desarrollan esta enfermedad, como revela la inmunotinción de secciones de cerebros humanos obtenidas en la autopsia.

La administración oral de dendrímeros de poli(amidoamina) según la invención reivindicada se dirige a la inflamación en el tracto gastrointestinal (GI) así como en el sistema nervioso central (CNS) y administra fármacos capaces de producir mejoras funcionales. La administración oral del dendrímero conduce a una concentración significativa del dendrímero en las zonas lesionadas del intestino y el cerebro en ratones con ECN, con una localización más selectiva en las células inflamatorias. Sorprendentemente, la administración oral de un agente antiinflamatorio (N-acetilcisteína) mediante dendrímeros produce una mejora espectacular de la lesión cerebral y la lesión intestinal en animales con NEC. Esta localización selectiva del dendrímero en el intestino y el cerebro lesionados demuestra que la formulación oral del dendrímero debería ser útil para el tratamiento no quirúrgico de la ECN con preservación del intestino junto con el tratamiento de la inflamación sistémica asociada, incluida la neuroinflamación que provoca la lesión cerebral. Además, al localizar selectivamente el dendrímero marcado con fluoróforo en las células inflamatorias del intestino y el cerebro, esta tecnología también puede representar una herramienta de diagnóstico para la detección sensible de la ECN.

En la realización preferente, el dendrímero se utiliza para la administración al intestino y al cerebro de agentes antiinflamatorios e inhibidores de TLR4 conjugados con el dendrímero. Esto proporciona una opción no quirúrgica de preservar el intestino y prevenir/tratar la lesión cerebral asociada en neonatos prematuros con ECN, para prevenir o aliviar la lesión tanto del tracto gastrointestinal como del cerebro. Al coadministrar un agente de diagnóstico, los dendrímeros también pueden utilizarse para detectar de forma no invasiva y en tiempo real la inflamación y las lesiones en el intestino y el cerebro en la ECN. La localización selectiva de nanodispositivos de dendrímero en las células asociadas a la inflamación proporciona un enfoque para la detección no invasiva y en tiempo real de la inflamación y las lesiones en el intestino y el cerebro en NEC. Un diagnóstico preferente es un fluoróforo aprobado para uso humano como el verde de indocianina para la detección no invasiva.

Una formulación preferente incluye dendrímero PAMAM (generación 4-6) que tiene N-acetil cisteína unida al mismo en combinación con un inhibidor de TLR4. Los inhibidores de TLR4 preferentes incluyen inhibidores de moléculas pequeñas que inhiben la señalización de TLR4, en particular C34 {Neal, 2013 PLoS One. 2013;8(6):e65779}.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

El término "agente terapéutico" se refiere a un agente que puede administrarse para prevenir o tratar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una molécula pequeña, un peptidomimético, una proteína, péptido, carbohidrato o azúcar, lípido o surfactante, o una combinación de los mismos.

El término "tratar" se refiere a prevenir o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección. El tratamiento de la enfermedad o afección incluye la mejora de al menos un síntoma de la enfermedad o afección en particular, incluso si la fisiopatología subyacente no se ve afectada, como el

tratamiento del dolor de un sujeto mediante la administración de un agente analgésico, aunque dicho agente no trate la causa del dolor.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, portadores y/o formas de dosificación que son, dentro del ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una proporción beneficio/riesgo razonable. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, como un relleno líquido o sólido, diluyente, disolvente o material encapsulante que interviene en el transporte de cualquier composición de un órgano o parte del cuerpo a otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del agente terapéutico que produce algún efecto deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. La cantidad eficaz puede variar en función de factores como la enfermedad o afección que se esté tratando, las construcciones dirigidas concretas que se estén administrando, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un compuesto concreto sin necesidad de experimentos excesivos.

II. Formulación

A. Dendrímeros

El término "dendrímero" tal como se utiliza en el presente documento incluye, pero no se limita a, una arquitectura molecular con un núcleo interior, capas interiores (o "generaciones") de unidades repetitivas unidas regularmente a este núcleo iniciador, y una superficie exterior de grupos terminales unidos a la generación más externa. Ejemplos de dendrímeros incluyen, pero no se limitan a, PAMAM, poliéster, polilisina y PPI. Los dendrímeros PAMAM tienen terminaciones hidroxilo y pueden ser de cualquier generación de dendrímeros, incluyendo, pero sin limitarse a, dendrímeros PAMAM de 1ª generación, dendrímeros PAMAM de 2ª generación, dendrímeros PAMAM de 3ª generación, dendrímeros PAMAM de 4ª generación, dendrímeros PAMAM de 5ª generación, dendrímeros PAMAM de 6ª generación, dendrímeros PAMAM de 7ª generación, dendrímeros PAMAM de 8ª generación, dendrímeros PAM de 9ª generación o dendrímeros PAMAM de 10ª generación. La invención se refiere a un complejo dendrímero para su uso tal como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, en el que el complejo dendrímero consiste en un dendrímero terminado en hidroxilo poli(amidoamina) (PAMAM) que tiene uno o más agentes antiinflamatorios conjugados con el dendrímero. Los dendrímeros adecuados para su uso incluyen, entre otros, poliamidoamina (PAMAM), polipropilamina (POPAM), polietilenimina, polilisina, poliéster, ípticeno, poli(éter) alifático y/o dendrímeros de poliéter aromático. El polímero PEG multibrazo incluye un polietilenglicol que tiene al menos dos ramas con grupos terminales sulfhidrilo o tiopiridina; sin embargo, pueden utilizarse polímeros PEG con otros grupos terminales, como terminaciones succinimidilo o maleimida. Pueden utilizarse polímeros de PEG con un peso molecular de 10 kDa a 80 kDa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dendrímero PAMAM" significa dendrímero de poli(amidoamina), que puede contener diferentes núcleos, con bloques de construcción de amidoamina. El procedimiento para fabricarlas es conocido por los expertos en la materia y, por lo general, implica una secuencia de reacción iterativa de dos etapas que produce envolturas concéntricas (generaciones) de unidades dendríticas de β -alanina alrededor de un núcleo iniciador central. Esta arquitectura PAMAM de núcleo-cáscara crece linealmente en diámetro en función de las cáscaras añadidas (generaciones). Mientras tanto, los grupos superficiales se amplifican exponencialmente en cada generación según las matemáticas de ramificación dendrítica. Están disponibles en las generaciones G0 - 10 con 5 tipos de núcleo diferentes y 10 grupos funcionales de superficie. El polímero ramificado consiste en dendrímeros poliamidoamínicos (PAMAM) polipeptídicos.

De acuerdo con algunas realizaciones, los dendrímeros PAMAM utilizados pueden ser dendrímeros de 4ª generación o más, con grupos hidroxilo unidos a sus grupos funcionales superficiales. El polímero PEG multibrazo comprende polietilenglicol que tiene 2 o más ramas con grupos terminales sulfhidrilo o tiopiridina; sin embargo, pueden utilizarse polímeros PEG con otros grupos terminales, como terminaciones succinimidilo o maleimida. Pueden utilizarse polímeros de PEG con un peso molecular de 10 kDa a 80 kDa.

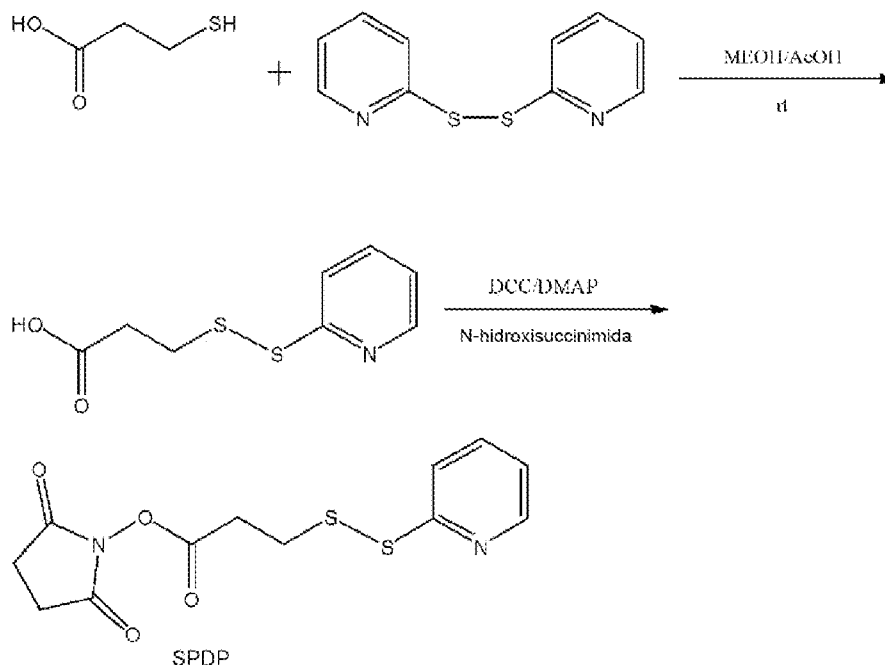
En algunas realizaciones, los dendrímeros están en forma de nanopartículas y se describen en detalle en la publicación de patente internacional nº WO2009/046446.

Preparación de PAMAM-NAC

A continuación se muestra un esquema sintético para conjugar *N*-acetilcisteína a un dendrímero PAMAM de cuarta generación terminado en amina (PAMAM-NH₂), usando 3-(2-piridilditio)propionato *N*-succinimidilo (SPDP) como enlazador.

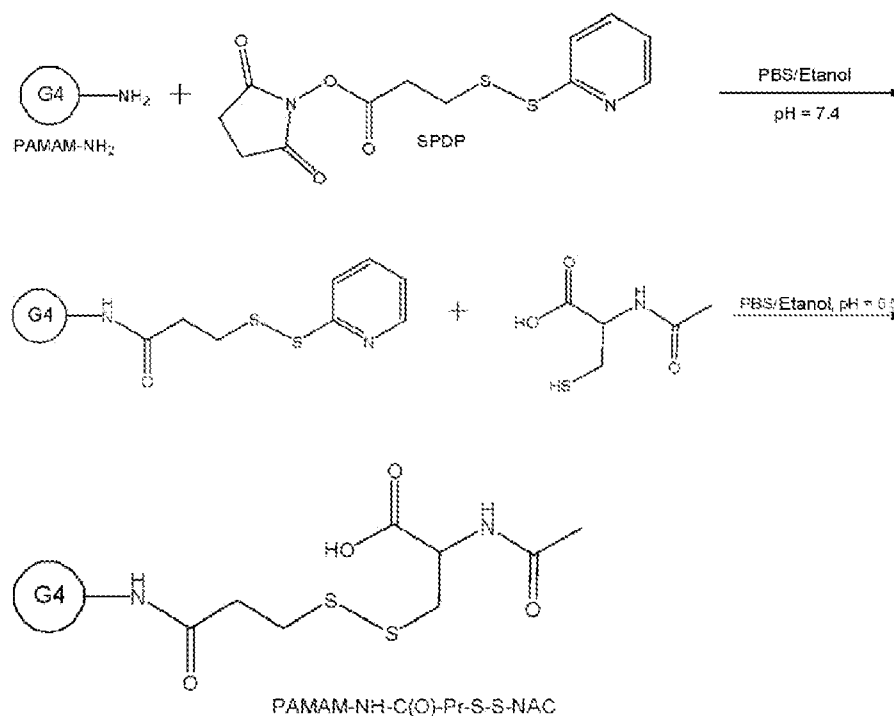
La síntesis de 3-(2-piridilditio)propionato N-succinimido (SPDP) se realiza mediante un procedimiento en dos etapas, Esquema 1. En primer lugar, el ácido 3-mercaptopropiónico se hace reaccionar por intercambio tiol-disulfuro con disulfuro de 2,2'-dipiridilo para dar disulfuro de 2-carboxietil 2-piridilo. Para facilitar la unión de dendrímeros terminados en amina al SPDP, el grupo succinimida se hace reaccionar con disulfuro de 2-piridilo 2-carboxietilo para obtener 3-(2-piridilditio)propionato de *N*-succinimido, mediante esterificación con *N*-hidroxisuccinimida utilizando *N,N'*-diclohexilcarbodiimida y 4-dimetilaminopiridina.

Esquema 1

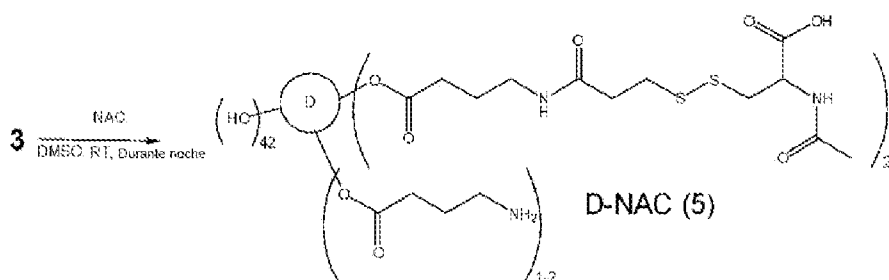


Para introducir grupos reactivos sulfhidrido, los dendrímeros PAMAM-NH₂ se hacen reaccionar con el reticulante heterobifuncional SPDP, Esquema 2. El éster activado *N*-succinimídico del SPDP se acopla a las aminas primarias terminales para dar lugar a grupos 2-piridilditiopropanoilo (PDP) unidos por amida, esquema 2. Tras la reacción con el SPDP, el PAMAM-NH-PDP puede analizarse mediante RP-HPLC para determinar el grado en que el SPDP ha reaccionado con los dendrímeros.

Esquema 2



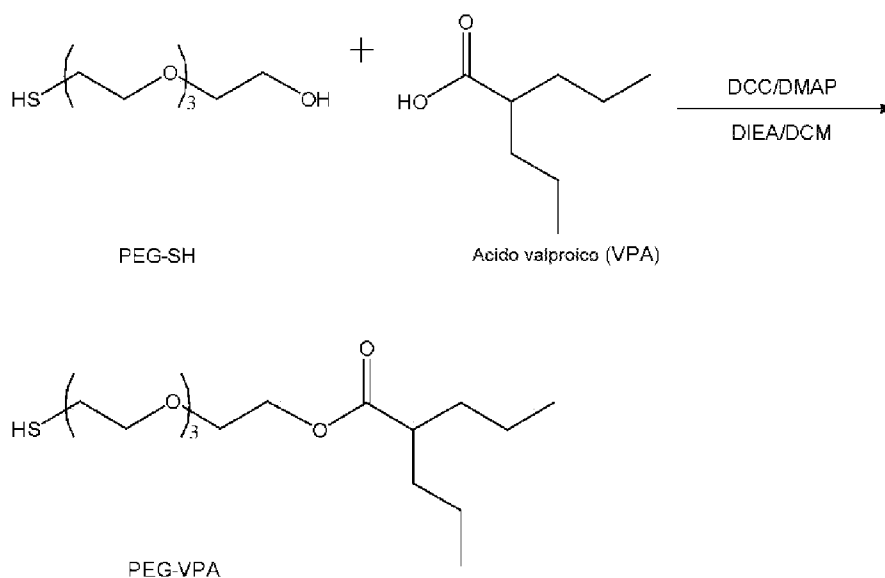
En otra realización, las rutas sintéticas descritas en el Esquema 4, dado a continuación, pueden utilizarse para sintetizar D-NAC hasta el dendrímero funcionalizado con piridilditio (PDP) **3**. A continuación, el compuesto **3** se hace reaccionar con NAC en DMSO, toda la noche a temperatura ambiente para obtener D-NAC **5**.



Preparación del conjugado dendrímero-PEG-ácido valproico (D-VPA)

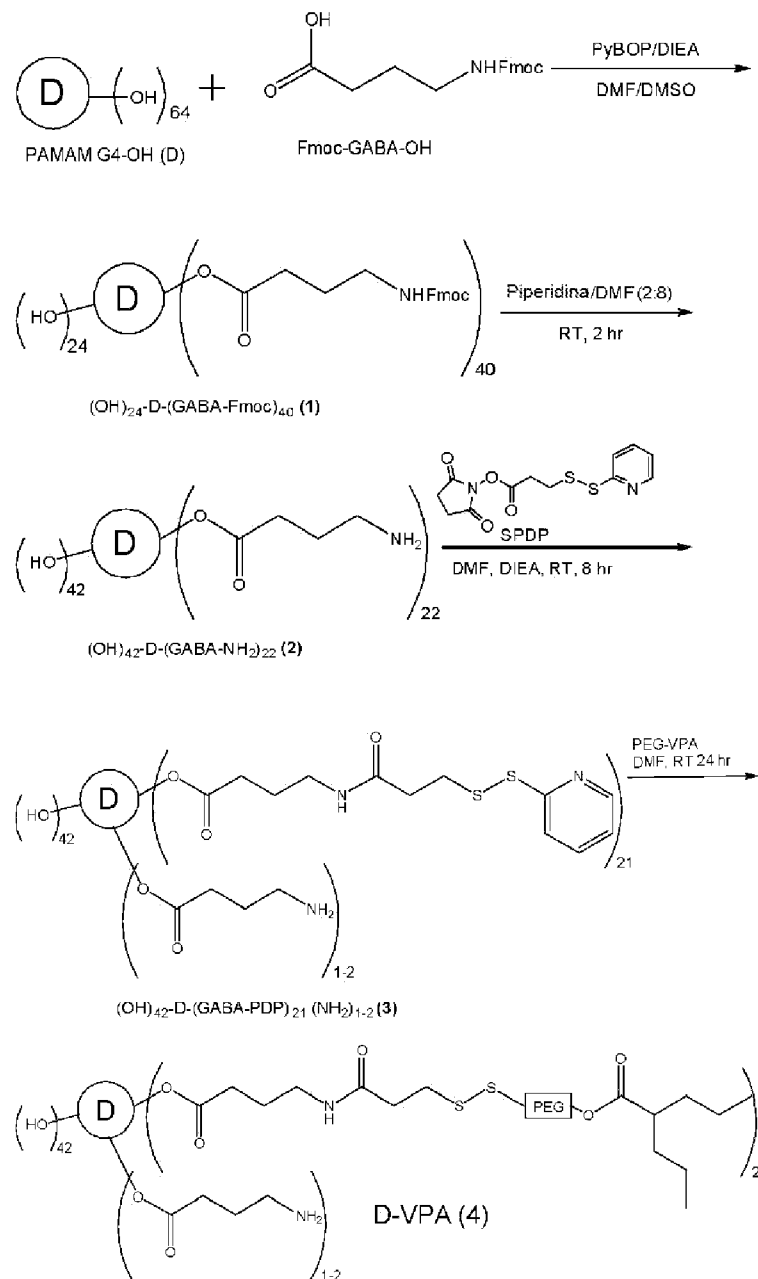
Inicialmente, el ácido valproico se funcionaliza con un grupo reactivo tiol. Un PEG-SH corto con tres unidades repetitivas de $(\text{CH}_2)_2\text{O}$ - se hace reaccionar con ácido valproico utilizando DCC como reactivo de acoplamiento, tal como se muestra en el Esquema 3. El PEG-VPA crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna y se caracteriza por RMN de protones. En el espectro de RMN, se produjo un desplazamiento hacia abajo del pico de protones CH_2 vecino al grupo OH del PEG a 4,25 ppm desde 3,65 ppm, lo que confirmó la formación de PEG-VPA. Aunque el grupo tiol también puede ser susceptible de reaccionar con la funcionalidad ácida, los espectros de RMN no indicaron ningún desplazamiento hacia abajo del pico perteneciente a los protones CH_2 adyacentes al grupo tiol del PEG. Esto sugiere que el grupo tiol es libre de reaccionar con el dendrímero funcionalizado tiol-reactivo.

Esquema 3



Para conjugar PEG-VPA con la PAMAM-OH, se introduce un enlace disulfuro entre el dendrímero y el ácido valproico, Esquema 4. En primer lugar, el dendrímero se convierte en un dendrímero bifuncional **1** haciendo reaccionar el dendrímero con ácido γ -aminobutírico (GABA) protegido con fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La conjugación del PEG-VPA con el dendrímero bifuncional implicó un proceso de dos etapas: la primera etapa es la reacción del dendrímero bifuncional funcionalizado con amina **1** con 3-(2-piridilditio)-propionato N-succinimido (SPDP), y la segunda etapa implica la conjugación del ácido valproico funcionalizado con tiol. El SPDP se hace reaccionar con el intermedio **2** en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) para obtener dendrímero **3** funcionalizado con piridilditio (PDP).

Esquema 4



Aunque se trata de un proceso de reacción *in situ*, la estructura se estableció mediante ^1H RMN. En el espectro, nuevos picos entre 6,7 y 7,6 ppm para protones aromáticos de grupos piridilo confirmaron la formación del producto. Se comprobó que el número de grupos piridilo y el número de enlazadores GABA eran iguales, lo que indica que la mayoría de los grupos amina reaccionaron con el SPDP. Dado que se trata de una etapa clave para la conjugación del fármaco con el dendrímero, se validó el uso de equivalentes molares de SPDP por grupo amino y el tiempo necesario para la reacción. Por último, el PEG-VPA se hace reaccionar con el dendrímero *in situ* funcionalizado con PDP para obtener el dendrímero-PEG-ácido valproico (D-VPA). La formación del conjugado final y la carga de VPA se confirmaron mediante ^1H RMN, y la pureza del conjugado se evaluó mediante HPLC en fase inversa. En el espectro de RMN, los multipletes entre 0,85 y 1,67 ppm para los protones alifáticos del VPA, los multipletes entre 3,53 y 3,66 ppm para los protones CH_2 del PEG y la ausencia de protones piridílicos aromáticos confirmaron la formación del conjugado. La carga del VPA es de ~21 moléculas, estimada mediante un procedimiento de integración de protones, lo que sugiere que quedan 1-2 grupos amina sin reaccionar. En el gráfico de HPLC, el tiempo de elución de D-VPA (17,2 min) es diferente del de G4-OH (9,5 min), lo que confirma que el conjugado es puro, sin trazas medibles de VPA (23,4 min) y PEG-VPA (39,2 min). El porcentaje de carga de VPA en el dendrímero es de ~12% p/p y valida el procedimiento para fabricar cantidades de gramos en tres lotes diferentes.

B. Agentes de acoplamiento y espaciadores

Los complejos de dendrímero pueden estar formados por agentes o compuestos terapéuticamente activos (en lo sucesivo "agente") conjugados o unidos a un dendrímero o PEG multibrazo. Los complejos dendrímeros utilizados en la invención están formados por uno o más agentes antiinflamatorios conjugados con un dendrímero terminado en hidroxilo poli(amidoamina) (PAMAM). La unión puede producirse a través de un espaciador apropiado que proporcione un puente disulfuro entre el agente y el dendrímero. Los complejos dendrímeros son capaces de liberar rápidamente el agente *in vivo* mediante reacciones de intercambio de tioles, en las condiciones reducidas que se encuentran en el organismo.

El término "espaciadores" tal como se utiliza en el presente documento pretende incluir composiciones utilizadas para unir un agente terapéuticamente activo al dendrímero. El espaciador puede ser una sola entidad química o dos o más entidades químicas unidas entre sí para establecer un puente entre el polímero y el agente terapéutico o el agente de imagen. Los espaciadores pueden incluir cualquier entidad química pequeña, péptido o polímeros que tengan terminaciones sulfhidrilo, tiopiridina, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona y carbonato.

El espaciador puede elegirse entre una clase de compuestos que terminan en sulfhidrilo, tiopiridina, succinimidilo, maleimida, vinilsulfona y grupo carbonato. El espaciador puede comprender compuestos terminados en tiopiridina como la ditiodipiridina, el 3-(2-piridilditio)-propionato N-succinimidilo (SPDP), el succinimidil 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato LC-SPDP o el Sulfo-LC-SPDP. El espaciador también puede incluir péptidos en los que los péptidos son lineales o cíclicos que tienen esencialmente grupos sulfhidrilo como glutatión, homocisteína, cisteína y sus derivados, arg-gly-asp-cys (RGDC), cyclo(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Cys) (c(RGDfC)), cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Cys), cyclo(Arg-Ala-Asp-d-Tyr-Cys). El espaciador puede ser un derivado del ácido mercapto, como el ácido 3 mercapto propiónico, el ácido 4 mercapto acético, el ácido 4 mercapto butírico, la tiolan-2-ona, el ácido 6 mercaptohexanoico, el ácido 5 mercapto valérico y otros derivados del mercapto, como el 2 mercaptoetanol y la 2 mercaptoetilamina. El espaciador puede ser ácido tiosalicílico y sus derivados, (4-succinimidiloxycarbonil-metil-alfa-2-piridiltio)tolueno, (3-[2-piriditio]propionil hidrazida, El espaciador puede tener terminaciones maleimidadas en las que el espaciador comprende polímero o pequeña entidad química como bis-maleimido dietilenglicol y bis-maleimido trietilenglicol, Bis-Maleimidoetano, bismaleimidoheptano. El espaciador puede comprender vinilsulfona, como 1,6-hexano-bis-vinilsulfona. El espaciador puede comprender tioglicósidos como la tioglucosa. El espaciador puede ser proteínas reducidas como la albúmina de suero bovino y la albúmina de suero humano, cualquier compuesto con terminación tiol capaz de formar enlaces disulfuro. El espaciador puede incluir polietilenglicol con terminaciones maleimida, succinimidil y tiol.

C. Agentes terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico

El término "complejos dendrímeros" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la combinación de un dendrímero -terminado en hidroxilo poli(amidoamina) (PAMAM) con un agente antiinflamatorio. Estos complejos dendrímeros incluyen un agente unido o conjugado a dendrímeros PAMAM, que son capaces de liberar preferentemente el fármaco intracelularmente en las condiciones reducidas encontradas *in vivo*. El complejo dendrímero, cuando se administra por inyección *i.v.*, puede atravesar preferentemente la barrera hematoencefálica (BBB) sólo en condiciones de enfermedad y no en condiciones normales.

El agente antiinflamatorio puede estar unido covalentemente o dispersado o encapsulado intramolecularmente. El dendrímero es preferentemente un dendrímero PAMAM hasta la generación 10, con terminaciones hidroxilo. El dendrímero está unido al agente antiinflamatorio a través de un espaciador que termina en enlaces disulfuro, éster o amida.

Los agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico antiinflamatorios representativos pueden ser péptidos, proteínas, carbohidratos, nucleótidos u oligonucleótidos, moléculas pequeñas o combinaciones de los mismos.

Un antiinflamatorio preferente es un fármaco antioxidante que incluye N-acetilcisteína. Los AINE preferentes incluyen ácido mefenámico, aspirina, Diflunisal, Salsalato, Ibuprofeno, Naproxeno, Fenoprofeno, Ketoprofeno, Deacetopropeno, Flurbiprofeno, Oxapropina, Loxoprofeno, Indometacina, Sulindaco, Etodolaco, Ketorolaco, Diclofenaco, Nabumetona, Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Droxicam, Lornoxicam, Isoxicam, Ácido meclofenámico, Ácido flufenámico, Ácido tolfenámico, elecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib, Lumiracoxib, Etoricoxib, Firocoxib, Sulfonamidas, Nimesulida, Ácido niflúmico y Licofelona.

Las moléculas pequeñas representativas incluyen esteroides tales como metil prednisona, dexametasona, agentes antiinflamatorios no esteroideos, incluidos inhibidores de COX-2, agentes antiinflamatorios corticosteroideos, agentes antiinflamatorios compuestos de oro, agentes inmunosupresores, antiinflamatorios y antiangiogénicos, agentes antiexcitotóxicos, como ácido valproico, D-aminofosfonovalerato, D-aminofosfonoheptanoato, inhibidores de la formación/liberación de glutamato, como baclofeno, antagonistas de los receptores NMDA, agentes antiinflamatorios salicilatos, ranibizumab,

agentes anti-VEGF, incluido aflibercept, y rapamicina. Otros antiinflamatorios son los fármacos no esteroideos como la indometacina, la aspirina, el paracetamol, el diclofenaco sódico y el ibuprofeno. Los corticosteroides pueden ser acetónido de fluocinolona y metilprednisolona. El fármaco peptídico puede ser estreptidocinasa.

Muchas enfermedades inflamatorias pueden estar relacionadas con una señalización patológicamente elevada a través del receptor del lipopolisacárido (LPS), el receptor tipo Toll 4 (TLR4). Por ello, ha habido un gran interés en el descubrimiento de inhibidores de TLR4 como posibles agentes antiinflamatorios. Recientemente se resolvió la estructura de TLR4 unido al inhibidor E5564, lo que permitió diseñar y sintetizar nuevos inhibidores de TLR4 dirigidos al dominio de unión a E5564. Se describen en la Patente estadounidense nº 8.889.101. Según Neal, et al., PLoS One. 2013; 8(6): e65779e, un algoritmo de búsqueda de similitudes utilizado junto con un enfoque de cribado limitado de bibliotecas de moléculas pequeñas identificó compuestos que se unen al sitio E5564 e inhiben TLR4. El compuesto principal, C34, es un 2-acetamidopiranosido (MW 389) con la fórmula $C_{17}H_{27}NO_9$, que inhibe TLR4 en enterocitos y macrófagos *in vitro*, y reduce la inflamación sistémica en modelos murinos de endotoxemia y enterocolitis necrotizante. El acoplamiento molecular del C34 al bolsillo interno hidrofóbico del correceptor TLR4 MD-2 demostró un ajuste apretado, incrustando el anillo de pirano profundamente dentro del bolsillo. Sorprendentemente, el C34 inhibió la señalización del LPS *ex vivo* en el íleon humano resecado de lactantes con enterocolitis necrotizante. Estos hallazgos identifican al C34 y al análogo β -anomérico del ciclohexilo C35 como nuevas pistas para inhibidores de TLR4 de molécula pequeña que tienen un beneficio terapéutico potencial para las enfermedades inflamatorias mediadas por TLR4.

El documento de Wipf, et al., Tetrahedron Lett. 2015 56(23):3097-3100 ("Wipf"), describe análogos del C34. Se utilizó una solvolisis mediada por cobre(II) de oxazolinan anoméricas y una conversión mediada por ácido de pentaacetatos de β -glucosamina y β -galactosamina para generar análogos de C34 en el carbono anomérico y en C-4 del anillo de piranosa. Se evaluó la influencia de estos compuestos sobre la señalización inflamatoria mediada por TLR4 en cultivos de enterocitos y monocitos. Su eficacia se confirmó utilizando un ratón reportero de NF- κ B-luciferasa, estableciendo así el primer estudio de relación estructura-actividad (SAR) de esta serie e identificando el isopropil 2-acetamido- α -galactósido más eficaz **17**. Estos datos demuestran que el C34, sus análogos u otros inhibidores de TLR4 pueden conjugarse con los dendrímeros para su uso en las formulaciones orales.

El complejo dendrímero también puede utilizarse para administrar agentes antiexcitotóxicos y D-antiglutamato. Los candidatos preferentes son: MK801, Memantina, Ketamina, 1-MT.

Los oligonucleótidos representativos incluyen ARNs, microARN, ADN y ARN. El agente terapéutico puede ser un dendrímero PAMAM con terminaciones amina o hidroxilo.

Los complejos dendrímeros unidos a un compuesto bioactivo o agente terapéuticamente activo pueden utilizarse para realizar varias funciones, incluyendo la focalización, la localización en un sitio enfermo, la liberación del fármaco y la obtención de imágenes. Los complejos dendrímeros pueden marcarse con o sin sustancias diana, de forma que se forme un enlace disulfuro entre el dendrímero y el agente o el agente de formación de imágenes a través de una molécula espaciadora o enlazadora.

D. Dispositivos y formulaciones

Los dendrímeros de la presente invención se administran por vía oral. Los portadores o diluyentes en la presente memoria utilizados pueden ser portadores sólidos o diluyentes para formulaciones sólidas, portadores líquidos o diluyentes para formulaciones líquidas, o mezclas de los mismos.

Para formulaciones líquidas, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser, por ejemplo, soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol y los ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones alcohólicas/acuosas, ciclodextrinas, emulsiones o suspensiones, incluidos los medios salinos y tamponados.

Ejemplos de aceites son los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, oliva, vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen, por ejemplo, el ácido oleico, el ácido esteárico y el ácido isosteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los vehículos incluyen, por ejemplo, solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato y aceites fijos. Las formulaciones incluyen, por ejemplo, soluciones de inyección estériles, acuosas y no acuosas, isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizantes y conservantes. Los vehículos pueden incluir, por ejemplo, reponedores de fluidos y

nutrientes, reponedores de electrolitos como los basados en dextrosa de Ringer. En general, el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y las soluciones azucaradas afines son los portadores líquidos preferentes. También pueden formularse con proteínas, grasas, sacáridos y otros componentes de las fórmulas infantiles.

III. Procedimientos de tratamiento

A. Trastornos o enfermedades a tratar

La invención expuesta en la reivindicación adjunta se dirige a complejos dendrímeros para su uso en el tratamiento de un trastorno gastrointestinal inflamatorio caracterizado por inflamación en el tracto gastrointestinal y/o el sistema nervioso central. El receptor inmunitario innato receptor tipo Toll 4 (TLR4) ha sido reconocido como el receptor de las células hematopoyéticas y no hematopoyéticas para la endotoxina bacteriana (lipopolisacárido, "LPS"), así como para una variedad de moléculas endógenas que se liberan durante trastornos inflamatorios o infecciosos. Se han atribuido varias enfermedades a la señalización exagerada de TLR4, incluidos procesos infecciosos y no infecciosos. Entre ellas figuran la enterocolitis necrotizante (ECN), la sepsis abdominal, la neumonía, la artritis, la pancreatitis y la aterosclerosis. En una realización preferente, la enfermedad a tratar es la NEC.

La composición de complejo dendrímero, que incluye un dendrímero unido a uno o más agentes antiinflamatorios, puede dirigirse selectivamente a microglía y astrocitos, que desempeñan un papel clave en la patogénesis de la ECN. La N-acetil cisteína ("NAC") se ha investigado y estudiado ampliamente. También se investiga la neuroinflamación asociada a las infecciones maternofetales. Sin embargo, la NAC presenta una baja biodisponibilidad debido a su elevada unión a las proteínas plasmáticas. Las composiciones de complejos dendrímeros superan la unión a proteínas plasmáticas sin afectar a la actividad de la NAC. G4 PAMAM-NAC puede ser de diez a cien veces más eficaz *in vivo* que el fármaco libre NAC mediante administración i.v. única. El fármaco libre NAC presenta una unión a proteínas plasmáticas muy elevada, lo que resulta en una biodisponibilidad reducida. Una de las principales ventajas de este complejo dendrímero es que mejora la biodisponibilidad al restringir las interacciones no deseadas entre el fármaco y la proteína plasmática, y produce de forma selectiva una rápida liberación intracelular del fármaco para ejercer la acción terapéutica deseada.

La elevada carga útil del fármaco NAC en el G4 PAMAM-NAC requiere cantidades muy pequeñas (10 mg) del portador, el dendrímero PAMAM, reduciendo así las cantidades administradas diariamente. Una menor cantidad de agente limita los efectos secundarios asociados al mismo. Dado que la biodisponibilidad del agente sigue siendo alta, los efectos positivos del agente no disminuyen a pesar de la administración de cantidades menores de agente. Los complejos dendrímeros, incluidos los conjugados dendrímero-fármaco, restringen su biodistribución a tejidos y órganos y administran el fármaco preferentemente en el lugar diana, reduciendo así los efectos secundarios no deseados.

Los complejos dendrímeros se transportan eficazmente a través de la BBB y, por lo tanto, son útiles para la administración dirigida de fármacos en trastornos neurológicos, del neurodesarrollo y neurodegenerativos y en lesiones cerebrales. Los conjugados G4-PAMAM-S--S-NAC se dirigen específicamente a células microgliales y astrocitos activados en trastornos neuroinflamatorios. Se evaluó la eficacia terapéutica del conjugado de dendrímero G4-PAMAM-S--S-NAC tras dos días de tratamiento animal con lipopolisacárido (LPS) para inducir lesión de la sustancia blanca e hipomielinización en el cerebro de conejo en desarrollo (un modelo animal de parálisis cerebral). La NAC administrada selectivamente desde los complejos dendrímeros G4-PAMAM-S--S-NAC suprimió fuertemente las citoquinas proinflamatorias (TNF-.alpha., IL-6 mRNA), los factores de señalización inflamatoria, incluyendo NF.kappa.B y nitrotirosina, y aumentó el nivel de GSH. El G4-PAMAM-S--S-NAC resultó ser entre diez y cien veces más eficaz que el NAC libre. Esto apoya la conclusión de que la G4-PAMAM-S--S-NAC atravesó la BBB. La administración dirigida de NAC a partir de un complejo dendrímero a células microgliales activadas mejoró los déficits motores y atenuó la recuperación de la lesión cerebral inducida por LPS en un modelo neonatal de conejo con parálisis cerebral.

Se observó una reducción significativa de las citoquinas proinflamatorias (TNF-.alpha., IL-6 mRNA) en la administración de complejos de dendrímero G4-PAMAM-S--S-NAC. Los kits tratados con NAC y G4-PAMAM-S--S-NAC mostraron una disminución de la respuesta inflamatoria fetal con mejora de los déficits motores en comparación con los kits que fueron tratados con solución salina. Los kits que fueron tratados con conjugados G4-PAMAM-S--S-NAC tuvieron menos cambios de comportamiento y menor activación microglial en el cerebro en comparación con los kits que recibieron NAC solo debido a la administración sostenida de NAC del conjugado G4-PAMAM-S--S-NAC. Los resultados indicaron que los conjugados G4-PAMAM-S--S-NAC tienen un mayor efecto que la NAC sola, ya que es captada preferentemente por los macrófagos activados y las células microgliales, reduciendo los efectos inflamatorios y oxidativos y nitrosativos.

El tratamiento con complejos dendrímeros G4-PAMAM-S--S-NAC redujo la lesión de la sustancia blanca y la activación de la microglía. Se observó una reducción significativa de la dosis de NAC cuando se administró como G4-PAMAM-S--S-NAC para obtener una respuesta similar a la observada para la NAC

libre. Tanto la NAC libre a una concentración de 100 mg/kg como la G4-PAMAM-S--S-NAC a una concentración de 10 mg/kg, 10 mg provocan respuestas idénticas, lo que demuestra que al conjugarla con el dendrímero se consigue una reducción de la dosis. El G4-PAMAM-S- -S-NAC a concentraciones más bajas que el NAC libre muestra efectos protectores significativos contra las lesiones cerebrales inducidas por LPS, supresión del TNF- α y regulación a la baja de la actividad de la IL-6. Esta actividad de los conjugados dendrímero-NAC puede atribuirse a su capacidad para interferir en las primeras respuestas inflamatorias mediante el bloqueo o la modificación del factor de transducción de señales NF- κ B y la nitrotirosina, modulando así la activación celular. Los conjugados PEG-NAC de 6 y 8 brazos liberaron el 74% de NAC en la concentración intracelular de GSH (2 y 10 mM), en 2 horas. En un rango de concentración de entre 0,008-0,8 mM, los conjugados no eran tóxicos para las células microgliales. A una concentración equimolar de NAC (0,5 mM), el 6-brazo-PEG-S--S-NAC y el 8-brazo-PEG-S--S-NAC fueron más eficaces en la inhibición de la depleción de GSH que el NAC libre. Los conjugados de 6 y 8 brazos-PEG-S--S-NAC, cada uno a una concentración de 0,5 mM y 5 mM mostraron una inhibición significativa en la producción de ROS en comparación con la NAC libre a concentraciones equimolares. Los estudios demuestran que los conjugados son superiores en la inhibición de la producción de NO en comparación con la NAC libre. A la concentración más alta (5 mM), el fármaco libre redujo los niveles de H_2O_2 y los niveles de nitrito en un 30-40%, mientras que los conjugados redujeron los niveles de H_2O_2 y nitritos en más del 70%. Esto muestra que los conjugados son capaces de traficar con el fármaco dentro de las células, y liberar el fármaco en forma libre y son significativamente más eficaces que el fármaco libre. A una concentración de 5 mM, el conjugado 6-arm-PEG-S--S-NAC (1) mostró una inhibición significativa (70%) de la producción de TNF- α , en comparación con una concentración equivalente de NAC (Pb0,05). El conjugado 8-arm-PEG-S- -S-NAC (3) mostró una inhibición significativa de la producción de TNF- α . (70%) a 5 mM en comparación con una concentración equivalente de NAC (Pb0,05 y Pb0,01). El NAC PEGilado es un complejo dendrímero con utilidad para la industria farmacéutica, ya que los PEG están aprobados para uso humano y este dispositivo resuelve las limitaciones del NAC y proporciona una mayor eficacia.

B. Dosificaciones

Típicamente, el médico decidirá la dosis de la composición con la que tratar a cada sujeto individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, el compuesto a administrar, la vía de administración y la gravedad de la afección que se está tratando. La dosis de las composiciones puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto tratado, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, y de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.

En general, el momento y la frecuencia de administración se ajustarán para equilibrar la eficacia de un tratamiento o esquema de diagnóstico dado con los efectos secundarios del sistema de administración dado. Las frecuencias de dosificación ejemplares incluyen la infusión continua, las administraciones únicas y múltiples, como la dosificación horaria, diaria, semanal, mensual o anual.

Se entenderá por los profesionales de habilidad ordinaria que un régimen de dosificación utilizado en los procedimientos inventivos puede ser cualquier longitud de tiempo suficiente para tratar el trastorno en el sujeto. El término "crónico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que la duración del régimen de dosificación puede ser de horas, días, semanas, meses o, posiblemente, años.

Los complejos dendrímeros pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos adicionales, que se sabe que son capaces de tratar afecciones o enfermedades discutidas anteriormente.

La presente invención se comprenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos

Ejemplo 1: Tratamiento de la enterocolitis necrotizante

El desarrollo de la ECN requiere la activación del receptor bacteriano receptor tipo Toll 4 (TLR4) en el epitelio intestinal, ya que los ratones que carecen de TLR4 están protegidos frente a la ECN, mientras que los seres humanos con ECN presentan un aumento de la activación de TLR4 en el intestino. La activación de TLR4 en el epitelio intestinal conduce a la activación de la microglía, lo que resulta en la pérdida de mielina en la corteza prefrontal, y el desarrollo de deterioro cognitivo en ratones de una manera que se asemeja mucho a la enfermedad observada en los seres humanos.

Los dendrímeros de poli(amidoamina) se dirigen a la inflamación en el SNC y administran fármacos para producir mejoras funcionales. Como se demuestra en el siguiente ejemplo, la administración oral del dendrímero conduce a una acumulación significativa del dendrímero en las zonas lesionadas del intestino y el cerebro en ratones con ECN, con una localización selectiva adicional en las células inflamatorias. Sorprendentemente, la administración oral de un agente antiinflamatorio (N-acetilcisteína) mediante dendrímeros produce una mejora espectacular de la lesión cerebral y la lesión intestinal en animales con NEC. Esta localización selectiva del dendrímero en el intestino y el cerebro lesionados tiene implicaciones para el tratamiento no quirúrgico de la ECN con preservación del intestino junto con el tratamiento de la

inflamación sistémica asociada, incluida la neuroinflamación que provoca la lesión cerebral. La localización selectiva del dendrímero marcado con fluoróforo en las células inflamatorias del intestino también puede utilizarse como herramienta de diagnóstico para la detección sensible de la ECN.

Materiales y procedimientos

Dendrimeros. Los materiales y procedimientos detallados utilizados en los experimentos que se indican a continuación, incluidos los protocolos para fabricar los conjugados dendrímeros-Cy5 y dendrímeros-fármaco, han sido descritos por Kannan S et al Sci. Transl. Med., 4:130ra46 (2012) y en la Patente estadounidense nº 8.889.101.

Conjugación de conjugados dendrímeros. La conjugación de dendrímeros con Cy5 se realizó mediante procedimientos comunicados previamente (Kannan et al., Science Trans. Med (abril, 2012). Para los experimentos con fármacos, los dendrímeros se conjugaron con N-acetil-cisteína y se administraron en dosis que oscilaban entre 2 y 20 mg/kg en distintos momentos.

Análisis estadístico. Los datos se analizaron para determinar la reproducibilidad mediante la prueba t de Student para determinar la significación entre dos grupos. Se consideró significativo un valor p igual o inferior a 0,05.

Modelo animal de ECN. Se expuso a ratones neonatos (días postnatales 6 - 11) a un modelo bien establecido de enterocolitis necrotizante (ECN). Brevemente, las crías fueron alimentadas con fórmula suplementada con bacterias aisladas de ECN humano por sonda cinco veces al día y sometidas a hipoxia (5% O₂, 95% N₂) durante 10 min en una cámara hipóxica dos veces al día durante 4 días.

Se emplearon dos protocolos experimentales para determinar los efectos agudos frente a los efectos a largo plazo de la ECN en el cerebro. Para determinar los efectos agudos, se recogieron muestras cerebrales inmediatamente después de la finalización del protocolo NEC (día postnatal 11), tras lo cual se realizó una evaluación inmunohistoquímica de la mielinización y la activación microglial. Las implicaciones conductuales de la exposición a NEC se determinaron 3 semanas después de la finalización del protocolo NEC (día postnatal 32 - 46) utilizando un laberinto acuático de Morris y pruebas de reconocimiento de objetos nuevos.

Terapias con dendrímeros-NAC. Dendrimeros conjugados con N-acetilcisteína (D-NAC) administrados por sonda oral a una dosis clínicamente relevante de 18 mg/kg en base NAC (100 mg/kg en base conjugado D-NAC), en los días 2 y 3 del protocolo NEC (es decir, días postnatales 8 y 9).

Para la obtención de imágenes, los dendrímeros marcados con Cy5 (D-Cy5) se administraron por sonda oral a 100mg/kg el día 3 del protocolo NEC, con pocas horas de retraso tras la última dosis de D-NAC.

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La pureza de los conjugados dendrímero-Cy5 (D-Cy5) se analizó utilizando un instrumento HPLC de Waters (Waters Corporation, Milford, Massachusetts) equipado con desgasificador en línea de Waters, bomba binaria, detector de matriz de fotodiodos (PDA), detector λ de fluorescencia múltiple y muestreador automático (mantenido a 4°C) interconectado con el software Empower. El cromatograma de HPLC se monitorizó simultáneamente para absorbancia a 210 nm para el dendrímero y 650 nm para Cy5 utilizando el detector Waters 2998 PDA y fluorescencia con excitación a 645 nm y emisión a 662 nm utilizando el detector de fluorescencia Waters 2475. El agua/acetonitrilo (0,1% p/p TFA) se preparó en fresco, se filtró, se desgasificó y se utilizó como fase móvil. Se utilizó TSK-Gel ODS-80 Ts (250 X 4,6 mm, 25 cm de longitud con un tamaño de partícula de 5 μ m) conectado a una columna de guarda TSK-Gel. Se utilizó un flujo en gradiente con una condición inicial de 90:10 (H₂O/ACN) y luego se aumentó gradualmente la concentración de acetonitrilo a 10:90 (H₂O/ACN) en 30 min y se volvió a la condición inicial original de 90:10 (H₂O/ACN) en 60 min con un flujo de 1 ml/min.

Inmunohistoquímica y microscopía confocal. Los cortes de Brian se fijaron en paraformaldehído al 2% (PFA) en PBS. Los cerebros se congelaron en sacarosa al 20% con compuesto de temperatura óptima de corte (OCT) (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA) en una proporción de 1:2 respectivamente utilizando hielo seco en isopentano. Los criobloques se almacenan a -80 °C hasta que se seccionan. Se cortaron secciones de 8 μ m de bloques congelados utilizando un criostato. Las secciones se incubaron en molécula de conejo anti-Ionised Calcium Binding Adapter 1 (Iba-1) (Wako chemicals, EE.UU.), que es un marcador celular de microglía, y se aplicó un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo-Cy3. Las secciones se analizaron en un microscopio confocal Zeiss 510. Las longitudes de onda de excitación y emisión y los ajustes del láser fueron idénticos para analizar todos los tejidos de los animales inyectados por vía intravenosa. Se tomaron pilas Z de secciones y se colapsaron para obtener una imagen a través de la profundidad de toda la sección.

Resultados

Las crías expuestas a NEC muestran un déficit cognitivo significativo, evidenciado por un deterioro de la memoria de trabajo y del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y en pruebas conductuales de reconocimiento de objetos nuevos. Estos hallazgos se correlacionan con evaluaciones histopatológicas

de la mielinización cerebral y la activación microglial. Los animales expuestos a ECN presentan un patrón de mielinización deficiente en comparación con los animales de control, lo que resulta especialmente evidente por la disminución de la expresión de la proteína básica de la mielina (MBP) en el mesencéfalo y el cuerpo calloso. Además, los animales tratados con NEC muestran una mayor activación microglial a nivel del cuerpo calloso, el hipocampo y el mesencéfalo en comparación con los controles.

Los dendrímeros administrados por vía oral son captados fácilmente por el intestino, y mostraron una biodistribución dependiente de la patología. Se observó que el dendrímero se acumulaba sobre todo en la corteza cerebral, especialmente en la corteza parietal y la corteza motora. También se observó la acumulación de D-Cy5 en el tálamo y los núcleos talámicos.

La administración de D-NAC durante la ECN conduce a un efecto protector en el cerebro, como se evidencia por una captación reducida de D-Cy5 (indicativa de un menor nivel de inflamación, reducción de la activación microglial y patrón de mielinización normal, en comparación con ratones con ECN no tratados. Los efectos protectores de la D-NAC se observaron a pesar de que los animales mostraban claras evidencias de enterocolitis necrotizante mediante evaluación histopatológica y qRT-PCR.

En todos los grupos de ratones dosificados con dendrímeros marcados con Cy5 (D-Cy5), los dendrímeros se acumularon en el intestino, captados por las células epiteliales de las vellosidades intestinales, lo que indica que D-Cy5 se absorbió en la vía GI y se repartió en la circulación sistémica.

En los ratones alimentados con fórmula (NEC), se observó que los dendrímeros marcados con Cy5 (D-Cy5) se acumulaban principalmente en la corteza cerebral, especialmente en la corteza parietal y la corteza motora (Figura 2). También se observó la acumulación de D-Cy5 en el tálamo y los núcleos talámicos.

Para identificar aún más la co-localización celular de D-Cy5 en la región de interés, se examinó la corteza somatosensorial en la región parietal a mayor aumento. En la corteza somatosensorial, la mayor parte de la localización de D-Cy5 parece estar en la capa 2-5 de la corteza, y forma un patrón de captación celular.

En el tálamo y los núcleos talámicos, la D-Cy5 mostró claramente una co-localización celular, con una captación celular dominante por células no marcadas, y cierta captación por microglía/macrófagos activados.

Además, el tratamiento con D-NAC disminuyó significativamente la activación microglial asociada a NEC, la acumulación de D-Cy5 en la región periventricular y mejoró en gran medida la mielinización en los cerebros de ratones alimentados con fórmula. El tratamiento con D-NAC disminuyó la acumulación de D-Cy5 en la región periventricular del cerebro en los ratones alimentados con fórmula. En los ratones alimentados con leche materna (controles sanos positivos, sólo se observaron D-Cy5 en el plexo coroideo. En los ratones alimentados con fórmula (control negativo NEC), la D-Cy5 se acumuló en la región periventricular en gran cantidad y formó un patrón disperso, presumiblemente debido a la captación celular. Tras el tratamiento con D-NAC a los ratones alimentados con fórmula (tratados con dendrímero NEC-NAC), la acumulación de D-Cy5 disminuyó significativamente alrededor de la región periventricular, observándose sólo una mínima cantidad de D-Cy5 en la capa externa del ventrículo. Dado que se ha mostrado que la captación de dendrímeros en el cerebro es proporcional al grado de inflamación, esto indica que el tratamiento oral con D-NAC redujo la neuroinflamación.

El tratamiento con D-NAC disminuyó la activación microglial asociada a NEC. En los ratones alimentados con leche materna y con leche de fórmula + tratamiento con D-NAC, las células microgliales tenían una población similar, con cuerpos celulares pequeños, lo que sugiere que las células microgliales estaban en "estado de reposo". Por el contrario, en los ratones NEC alimentados con fórmula (control), la población de microglía aumentó significativamente, con cuerpos celulares agrandados, lo que sugiere una activación microglial.

El tratamiento con D-NAC protegió contra el defecto de mielinización asociado a la ECN en los cerebros de ratones alimentados con fórmula. Los ratones alimentados con leche materna (control sano) y con leche de fórmula + tratamiento con D-NAC (ECN, tratados con D-NAC) presentaron un mayor grado de mielinización en el cerebro que los ratones alimentados únicamente con leche de fórmula (ECN no tratado), lo que indica que la reducción de la inflamación en el grupo alimentado con leche de fórmula + tratamiento con D-NAC benefició la reparación neurológica.

Se han obtenido resultados similares utilizando un modelo de lechón, descrito por Good, et al.. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014;306(11):G1021-32 10,1152;7(1):ajpgi.00452.2013 Epub 2014 abr 17.

REIVINDICACIONES

1. Un complejo dendrímero para uso en un procedimiento para tratar un trastorno gastrointestinal inflamatorio, el procedimiento comprende administrar oralmente a un sujeto un complejo dendrímero que consiste en un dendrímero terminado en hidroxilo poli(amidoamina) (PAMAM) que tiene uno o más agentes antiinflamatorios conjugados con el dendrímero, en el que el complejo dendrímero atraviesa la barrera hematoencefálica, en el que el uso es en un sujeto que tiene inflamación en el tracto gastrointestinal y/o un trastorno con complicaciones del sistema nervioso central.
2. El complejo dendrímero para uso según la reivindicación 1, en el que el dendrímero PAMAM es un dendrímero PAMAM G3, G4, G5 o G6.
3. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el dendrímero PAMAM está unido a uno o más agentes antiinflamatorios mediante un enlace disulfuro.
4. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dendrímero PAMAM está unido a uno o más agentes antiinflamatorios a través de uno o más compuestos espaciadores seleccionados del grupo que consiste en 3-(2-piridilditio)propionato N-succinimidilo (SPDP), glutatión (GSH), ácido gamma-aminobutírico (GABA), y combinaciones de los mismos.
5. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que al menos uno de los uno o más agentes antiinflamatorios es N-acetil cisteína.
6. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que al menos uno de los uno o más agentes antiinflamatorios es un inhibidor del receptor tipo Toll 4.
7. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el trastorno a tratar es la enterocolitis necrotizante (ECN).
8. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el trastorno a tratar se selecciona del grupo que consiste en sepsis abdominal y pancreatitis.
9. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene inflamación en el tracto gastrointestinal y un trastorno con complicaciones en el sistema nervioso central.
10. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el complejo dendrímero se administra en una dosis entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.
11. Un complejo dendrímero para uso en un procedimiento para diagnosticar un trastorno gastrointestinal inflamatorio, el procedimiento comprende administrar oralmente a un sujeto un complejo dendrímero que consiste en un dendrímero terminado en hidroxilo poli(amidoamina) (PAMAM) que tiene uno o más agentes de diagnóstico conjugados al dendrímero, en el que el complejo dendrímero atraviesa la barrera hematoencefálica, en el que el agente de diagnóstico es un fluoróforo, en el que el uso es en un sujeto que tiene inflamación en el tracto gastrointestinal y/o un trastorno con complicaciones en el sistema nervioso central.
12. El complejo dendrímero para uso según la reivindicación 11, en el que el dendrímero PAMAM es un dendrímero PAMAM G3, G4, G5 o G6.
13. El complejo dendrímero para uso según la reivindicación 11, en el que el agente de diagnóstico es verde de indocianina.
14. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que los dendrímeros están formulados en una suspensión, emulsión, comprimido, cápsula o lavado.
15. El complejo dendrímero para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que los dendrímeros se formulan en una fórmula para lactantes.