

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 209**

51 Int. Cl.:

H01F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2012 E 16000350 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3038115**

54 Título: **Método para fabricar nanopartículas magnéticas aglomerantes recubiertas con alcoxisilano**

30 Prioridad:

10.08.2011 US 201161522217 P

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

22.02.2021

73 Titular/es:

**MAGFORCE AG (100.0%)
Max-Planck-Strasse 3
12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**WALDÖFNER, NORBERT y
JORDAN, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 807 209 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

Método para fabricar nanopartículas magnéticas aglomerantes recubiertas con alcoxisilano

A pesar de los recientes avances en el tratamiento de los tumores sólidos, tales como anticuerpos, se mantiene la necesidad por opciones de tratamiento más eficaces y rentables.

5 La termoterapia o, más específicamente, la hipertermia es un acercamiento atractivo para el tratamiento del cáncer, con la que, en comparación con la quimioterapia o terapia de radiación, se espera un menor número de efectos secundarios para un amplio rango de enfermedades tumorales debido a su modo de acción físico. Sin embargo, las modalidades disponibles en la actualidad siguen siendo subóptimas (Moroz et al., 2002) y prometen mejora.

10 Una modalidad preferida de la termoterapia es un método en donde las nanopartículas magnéticas se introducen directamente en un tumor. Las nanopartículas se calientan posteriormente en un campo magnético alterno. Dependiendo de la duración del tratamiento y las temperaturas intratumorales alcanzadas, las células tumorales son destruidas ya sea directamente (ablación térmica) o sensibilizadas para quimioterapia o radioterapia concomitante (hipertermia). Con este nuevo procedimiento, es posible combatir el tumor desde dentro hacia fuera, evitando de ese modo el tejido sano circundante. Esta modalidad de tratamiento ha mostrado efectos terapéuticos
15 prometedores en el tratamiento del glioblastoma (Maier-Hauff et al., 2011).

A pesar de los resultados positivos de los primeros ensayos clínicos, todavía hay margen para mejorar la eficacia y/o reducir los efectos secundarios potenciales o limitaciones de la terapia. Un problema no resuelto es que, durante la instilación de las nanopartículas, las nanopartículas magnéticas se depositan fuera del área objetivo, en el tejido circundante. Tales depósitos externos o bien causan efectos secundarios no deseados, ya que aumentan la temperatura exterior del área
20 objetivo durante el calentamiento en el campo magnético alterno, o bien limitan la fuerza del campo magnético aplicable utilizado para calentar los depósitos de nanopartículas si se evita tal calentamiento del tejido circundante. Este problema puede ser debido a una alta presión dentro del tejido del tumor inyectado que conduce a un flujo de salida de las nanopartículas depositadas durante o inmediatamente después de la inyección. Por otra parte, aun cuando se requieren partículas a nanoescala con el fin de tener altas tasas de absorción específica (SAR, por sus siglas en inglés), tales nanopartículas pueden viajar fácilmente dentro del espacio intersticial y de esta manera pueden perderse del tejido objetivo.
25 Además, la cantidad de calor que puede ser 'depositado' dentro del tumor -depositando primero nanopartículas que posteriormente son excitadas por el campo magnético alterno - está limitada debido a una tasa de absorción específica (SAR) subóptima de las nanopartículas/el fluido magnético que se utilizan hasta ahora en la clínica.

30 Además, las nanopartículas deben ser fabricadas de una manera controlada en gran escala y costo razonable, y deben poderse formular en una formulación estable con el fin de convertirse en un producto comercializable.

El arte previo describe un número de métodos y usos de tales nanopartículas, tal como fue revisado por Gupta y Gupta (2005).

Lesniak et al. (1997) describen un proceso para la preparación de nanopartículas libres de aglomerados. El proceso incluye (i) preparar una suspensión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro que parcialmente forman aglomerados, (ii) agregar
35 trialcóxidosilanos y un disolvente orgánico polar miscible en agua, por ejemplo etilenglicol, (iii) tratar la suspensión resultante con ultrasonido con el fin de reducir la aglomeración, (iv) eliminar el agua mediante destilación bajo la acción de ultrasonido, y (v) eliminar los aglomerados restantes. El proceso resulta en nanopartículas libres de aglomerados con un recubrimiento resistente a la hidrólisis basado en alcoxisilanos. Sin embargo, estas nanopartículas, si se aplican localmente a tumores sólidos, permanecen sólo parcialmente en el sitio de la inyección probablemente debido a sus propiedades de estar libres
40 de aglomerados. Estas nanopartículas quedan ampliamente distribuidas en el cuerpo limitando de este modo tanto la cantidad restante de nanopartículas dentro del área objetivo como aumentando el riesgo de efectos secundarios debido a la acumulación de nanopartículas en los tejidos circundantes o en otras partes en el cuerpo. Además, el etilenglicol utilizado es muy difícil de eliminar debido a su interacción con los grupos amino del recubrimiento de alcoxisilano y su alto punto de ebullición (197 °C). Por lo tanto, la presencia de etilenglicol en el producto final limita la aplicabilidad de las nanopartículas
45 bajo aspectos de seguridad y regulatorios.

Ruefenacht et al. (2006) describen una formulación a base de polímero inyectable de nanopartículas que generan calor en un portador líquido, que es capaz de formar implantes *in situ* al entrar en contacto con un fluido o tejido corporal. Considerando que la presente formulación parece resolver el problema de flujo de salida de las nanopartículas del tumor, el sistema utiliza preferiblemente solventes tales como N-metil-2-pirrolidona (NMP) o
50 sulfóxido de dimetilo (DMSO). Se considera que ambos solventes generalmente tienen baja toxicidad y son de uso frecuente para las formulaciones de fármacos orales y transdérmicos. Sin embargo, poco se sabe de la inyección de los solventes en los tejidos o tumores, especialmente en el cerebro en el caso de tumores cerebrales. Por lo tanto, tales solventes deben ser evitados. Además, tales formulaciones se forman durante la inyección de un implante definido, mientras que en el contexto de la presente invención se ha previsto lograr una cierta distribución
55 de las nanopartículas inyectadas dentro del tumor/tejido que, sin embargo, se limita al tumor/tejido. Otra desventaja

de este sistema es el aumento de volumen previsto dentro del tumor, si estas formulaciones a base de polímeros inyectables se inyectan en los tumores, pueden causar problemas en ciertas indicaciones tumorales, especialmente, en tumores cerebrales, en donde el espacio dentro del cráneo es limitado. Juntas, tales formulaciones a base de polímeros no son apropiadas para el tratamiento de tumores no operables.

- 5 En el presente documento, se describen nanopartículas magnéticas biocompatibles mejoradas. En particular, se describe una nanopartícula magnética biocompatible mejorada para el tratamiento de tumores.

10 Como se muestra en los ejemplos, los inventores ahora han encontrado sorprendentemente que la aminosilanicación controlada de nanopartículas de óxido de hierro en la ausencia de solventes orgánicos conduce a nanopartículas magnéticas con una condensación incompleta de los aminosilanos superficiales que resulta en una formulación a base de agua estable de nanopartículas magnéticas (fluidos magnéticos), que pueden ser altamente concentradas. Durante la inyección en el tejido o tumor, estos fluidos magnéticos forman depósitos favorables con una alta velocidad de retención dentro del tejido objetivo. En consecuencia, los inventores proporcionan un método mejorado para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal magnéticas recubiertas con alcoxisilano, con una biocompatibilidad mejorada, formación de depósitos mejorados dentro del área objetivo y menos efectos secundarios debido a la ausencia de solventes orgánicos y/o flujo de salida reducido de las nanopartículas depositadas del área de tratamiento.

15 En consecuencia, la presente invención describe nanopartículas magnéticas biocompatibles con una alta tasa de absorción específica (SAR) que se pueden inyectar en la rutina diaria en el tejido tumoral, que permanecen en o cerca del sitio de la inyección dentro del área de tratamiento prevista, por ejemplo, el tumor, y no se extienden sustancialmente al tejido circundante. Además, la presente invención proporciona un proceso de fabricación robusto y rentable para tales nanopartículas magnéticas biocompatibles.

Definiciones

25 "Tasa de absorción específica" (SAR) es una medida de la tasa a la que la energía es absorbida por las nanopartículas después de la exposición al campo magnético alternante. Es dependiente de la intensidad de campo magnético y la frecuencia de la alternancia de la polarización del campo magnético. La SAR se determina preferiblemente de acuerdo con el método desarrollado por Jordan et al. (1993) a una frecuencia de 100 kHz y una intensidad de campo de hasta 18 kA/m, preferiblemente a 3,5 kA/m y se refiere a la masa de metal utilizado, por ejemplo, hierro (unidad W/g de metal).

30 "Potencial zeta" se refiere al potencial eléctrico medido de una nanopartícula coloidal en medio acuoso, medido con un instrumento tal como un Zetasizer Malvern 3000 HSA a un pH de 5,2 y una conductividad de 2,0 ms/cm (cada uno determinado a 25 °C). El potencial zeta describe el potencial en el límite entre solución a granel y la región de cizallamiento hidrodinámico o capa difusa.

El término "aproximadamente" significa una desviación del número dado o el valor de $\pm 10\%$, preferiblemente de $\pm 5\%$ y, especialmente, de $\pm 1\%$.

35 El término "magnético" incorpora magnético, paramagnético, ferromagnético, anti-ferromagnético, ferrimagnético anti-ferrimagnético y superparamagnético. Preferiblemente, las nanopartículas de acuerdo con esta invención son paramagnéticas, más preferiblemente ferromagnéticas, ferrimagnéticas, antiferrimagnéticas o superparamagnéticas.

Las nanopartículas pueden ser superparamagnéticas.

40 El término "nanopartículas" se entenderá como nanopartículas en el intervalo de nanómetros, es decir, nanopartículas de 1 a 100 nm con respecto a su núcleo de metal como se puede determinar mediante microscopía electrónica. Preferiblemente, las nanopartículas tienen un tamaño de 5 a 25 nm, más preferiblemente de 7 a 20 nm y especialmente de 9 a 15 nm.

"Nanopartícula de metal" se refiere a nanopartículas magnéticas, que contienen metal o iones metálicos.

45 "Solvente orgánico" significa un compuesto orgánico líquido, en este caso, un carbohidrato, con el poder para disolver los sólidos, gases o líquidos. Ejemplos de solventes orgánicos de acuerdo con la presente invención, incluyen, entre otros, etilenglicol, acetona, tolueno y equivalentes.

50 El término "recubrimiento de alcoxisilano" se refiere a un recubrimiento que resulta de la policondensación de alcoxisilanos, un proceso que también se conoce como "recubrimiento de aminosilano". El término "policondensación" tal como se utiliza en este documento generalmente se refiere a cualquier reacción de condensación de un monómero con dos grupos funcionales que conduce a la formación de un polímero.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnéticas se incuba con alcoxisilano, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo esencialmente en la ausencia de un solvente orgánico añadido, en donde el alcoxisilano es trialcoxisilano y en donde $0,3$ a $0,6 \times 10^{-3}$ mol de trialcoxisilano se añade por $0,9$ mol de metal.

En el contexto de la presente invención, el término "incubando" o "incubación" significa cualquier configuración experimental, condición experimental o mezcla de reacción que permita la policondensación de alcoxisilanos y, por lo tanto, el recubrimiento de aminosilano de las nanopartículas.

Como se muestra en los ejemplos, se ha encontrado que, para el tratamiento de tumores y otras enfermedades, los aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético pueden formar mejores depósitos dentro del área objetivo y que menos nanopartículas se pierden en la circulación o forman depósitos fuera del área objetivo que las nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético que no forman aglomerados. 'Aglomeración' en este contexto significa que varias nanopartículas individuales forman aglomerados o grupos de nanopartículas. "Aglomerados" se refieren a nanopartículas aglomeradas o grupos de nanopartículas.

El paso esencial del presente método es la incubación/reacción con alcoxisilanos esencialmente en ausencia de un solvente orgánico. "Esencialmente en la ausencia" significa que pequeñas trazas de solventes orgánicos pueden estar presentes, preferiblemente la cantidad de solventes orgánicos es menor que 10% en volumen, más preferiblemente menor que 5% en volumen, más preferiblemente menor que 1% en volumen, especialmente menor que 0,5% en volumen. Por ejemplo, pueden producirse pequeñas cantidades de metanol durante la reacción y, por lo tanto, en cierta medida, pueden permanecer en el producto. En una modalidad preferida, el recubrimiento se lleva a cabo en ausencia de un solvente orgánico, especialmente, el recubrimiento se lleva a cabo en ausencia de un solvente orgánico agregado. El solvente preferido para la reacción de recubrimiento es agua. Sin vincularse a ninguna teoría científica, los inventores asumen que estas condiciones de reacción conducen, sin embargo, a una reacción de condensación incompleta definida de los alcoxisilanos que se traduce en las propiedades de aglomeración de las nanopartículas.

El método de la presente invención se lleva a cabo preferiblemente en ausencia de etilenglicol. El etilenglicol interfiere con la reacción de recubrimiento de esta invención. Además, es muy difícil, si no imposible, eliminarlo por completo de la preparación de nanopartículas, puesto que, por lo general, cantidades relativamente grandes de etilenglicol permanecen unidas al recubrimiento de las nanopartículas y por su alto punto de ebullición de 197 °C. Esto se aplica también a las preparaciones elaboradas de acuerdo con Lesniak et al. (1997, supra). De acuerdo con la Farmacopea Europea, solamente 600 ppm de etilenglicol se permiten en el producto médico final, lo que hace que las preparaciones de nanopartículas con cantidades más altas de etilenglicol sean inaceptables para uso clínico comercial.

En una modalidad, las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, mientras que se prefieren las sales de hierro. Se prefieren las nanopartículas que comprenden hierro debido a su baja toxicidad en comparación con otros metales magnéticos tales como cobalto o níquel. En una modalidad preferida, el compuesto de complejo de hierro, los compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro están esencialmente libres de otros metales y otros contaminantes con el fin de evitar toxicidades. Es bien conocido en el arte previo que los productos químicos pueden contener trazas de contaminantes. Por lo tanto, "esencialmente libre" en este contexto significa preferiblemente que menos del 1% en peso, preferiblemente, menos de 0,1% en peso de otros contaminantes está comprendido dentro de los compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro. Especialmente preferidas son las sales de hierro esencialmente libres de otros contaminantes.

En una modalidad especialmente preferida, la sal de hierro es un óxido de hierro, preferiblemente magnetita y/o maghemita. Tales nanopartículas de hierro hechas de óxido de hierro pueden ser fabricadas por precipitación de una solución que contiene una mezcla cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio. "Nanopartículas de hierro", de acuerdo con esta invención, son nanopartículas que contienen átomos de Fe o iones de Fe.

Por lo tanto, en una modalidad preferida, la suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro es proporcionada por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio.

Aquí, la proporción entre cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) es preferiblemente de aproximadamente 2:1.

En el contexto de la presente invención, los términos "nanopartículas de hierro" y "nanopartículas de óxido de hierro" se utilizan de manera equivalente.

Las reacciones y condiciones de precipitación apropiadas han sido descritas por Massart (1981) y revisadas por Mohapatra y Anand (2010). Las condiciones preferidas para la reacción de precipitación son: (i) una proporción de cloruro de Fe (III) y

cloruro de Fe (II) de aproximadamente 2:1; (ii) verter la solución de cloruro de Fe (III) y cloruro de Fe (II) en una solución de hidróxido de sodio con una concentración de aproximadamente 2,13 M; (iii) la temperatura de precipitación de aproximadamente 25 °C, y (iv) tiempo para la reacción de precipitación de aproximadamente 52 min. Opcionalmente, la solución de hidróxido de sodio se vierte en la solución de cloruro de hierro (en lugar de vice versa) durante un período de aproximadamente 39 minutos a aproximadamente 15 °C. Un método para producir nanopartículas de óxido de hierro recubiertas por medio de la precipitación de sales de hierro en solución se describe en el Ejemplo 1.1.

Alternativamente, la suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro puede ser proporcionada por la descomposición térmica de una sal de hierro o un compuesto de complejo de hierro. El término “compuesto de complejo de hierro” como se usa en este documento generalmente se refiere a cualquier complejo que contiene hierro, preferiblemente, cualquier compuesto que comprende hierro complejado. Los métodos apropiados han sido descritos por Waldoefner y Stief (2011). En resumen, un compuesto que contiene hierro y un solvente orgánico se mantienen durante 10 min a una temperatura entre 50 °C y 50 °C por debajo de la temperatura de reacción. A continuación, la solución se calienta a 200 °C hasta 400 °C para producir nanopartículas. Las nanopartículas se oxidan con oxígeno, peróxido o un óxido de amina terciario, y se tratan con ácido nítrico y nitrato de hierro resultante en nanopartículas de maghemita. Otro método apropiado para la preparación de nanopartículas de óxido de hierro por la descomposición térmica ha sido descrito por Guardia et al. (Guardia et al., 2010a; Guardia et al., 2010b; Guardia et al., 2012). En resumen, acetilacetato de hierro (III) se mezcla con ácido decanoico en dibencil éter. La solución se calienta constantemente hasta 200 °C. Después de 2 horas a 200 °C, la solución se calienta hasta reflujo y se mantiene a esta temperatura durante 1 hora y finalmente se enfría a temperatura ambiente, se lava y se recoge por centrifugación. Ambos métodos son los preferidos debido a la alta SAR de las nanopartículas resultantes. Un método para producir nanopartículas de óxido de hierro por medio de la descomposición térmica de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 1.2.

Por lo tanto, en una modalidad preferida alternativa, la suspensión acuosa de las nanopartículas de óxido de hierro es proporcionada por la descomposición térmica de una sal de hierro o un compuesto de complejo de hierro.

Las sales de hierro y complejos de hierro que son aplicables en el método de la presente invención son bien conocidos por la persona experimentada en la técnica e incluyen, entre otros, cloruro de hierro (III), cloruro de hierro (II), acetilacetato de hierro (III), carbonilos de hierro y equivalentes.

En una modalidad preferida, las nanopartículas de metal son tratadas con H₂O₂ antes de la incubación/reacción con alcóxilano. Se prefiere este paso opcional puesto que el hierro se oxida completamente a Fe₂O₃ (maghemita) bajo condiciones definidas y, como consecuencia, pasos de reacción subsiguientes pueden llevarse a cabo en ausencia de un gas protector (por ejemplo, argón). De lo contrario, en la ausencia de H₂O₂, se prefiere trabajar bajo gas protector, tal como argón, con el fin de controlar las condiciones de reacción.

El alcóxilano es preferiblemente un trialcoxilano. Se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano (DIAMO), 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES), trimetoxisililpropil-dietilentriamina (TRIAMO) y N-(6-amino-hexil)-3-aminopropil-trimetoxisilano. En una modalidad especialmente preferida, el alcóxilano es 3-(2-aminoetil-amino)-propil-trimetoxisilano.

En una modalidad preferida adicional, la reacción de recubrimiento se lleva a cabo mediante la adición de 0,4 a 0,5 x 10⁻³ mol y especialmente desde 0,43 hasta 0,45 x 10⁻³ mol de trialcoxilano por 0,9 mol del metal.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la incubación/reacción con alcóxilano se lleva a cabo a un pH de entre 2 y 6 (lo que significa que también un pH de 2 o 6 se incluye en este intervalo), preferiblemente de entre 2,5 y 5,5, especialmente de 4,5 ± 1. Durante la incubación/reacción, el pH puede ajustarse a tales valores, si es necesario. El ácido acético se puede utilizar para ajustar el pH en consecuencia.

Preferiblemente, las nanopartículas magnéticas de metal se desintegran antes de la incubación/reacción con alcóxilano. Las nanopartículas se desintegran preferiblemente por tratamiento con ultrasonido con el fin de generar una suspensión de nanopartículas densas de electrones en forma de balón o cúbicas que después pueden ser sometidas a la reacción de recubrimiento. En una modalidad, el tratamiento de ultrasonido se realiza en un baño de ultrasonido a 45 kHz 30 minutos a 2 horas, especialmente durante aproximadamente 1 hora. Este método de desintegración se lleva a cabo preferiblemente en condiciones ácidas, preferiblemente entre pH 2,5 y 3,0. La desintegración de las nanopartículas de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 1,1.

Otro método apropiado para desintegrar las nanopartículas es la técnica de desaglomeración a base de láser/fragmentación de láser (Schnoor et al., 2010).

El método de esta invención además puede comprender el paso de desintegración de los aglomerados después de comenzar la reacción/incubación con alcóxilano, que se puede llevar a cabo como se describió anteriormente. En una modalidad, la desintegración de las nanopartículas comienza con o después del paso de recubrimiento. Sin embargo, en una modalidad preferida adicional, la etapa de desintegración comienza antes del paso de recubrimiento

y se lleva a cabo simultáneamente con y/o después del paso de recubrimiento. Especialmente, la desintegración se inicia antes del paso de recubrimiento y continúa durante y después del paso de recubrimiento. Preferiblemente, la desintegración se lleva a cabo para un total de aproximadamente 24 horas o más.

5 Durante el recubrimiento y la desintegración, se puede generar una suspensión que se puede almacenar de forma estable a temperatura ambiente, por lo que es una modalidad preferida. Sin vincularse a ninguna teoría científica, se asume que la mayoría de nanopartículas individuales están completamente recubiertas con el alcoxisilano, que se adhieren fácilmente a las nanopartículas vecinas y forman los aglomerados de acuerdo con esta invención, como se puede ver en la Figura 1. Sin embargo, la suspensión es suficientemente fluida para pasar fácilmente a través de jeringas y para ser inyectable en el tejido tumoral.

10 En una modalidad preferida, se lleva a cabo un paso adicional para la eliminación de aglomerados recubiertos de forma incompleta y/o muy grandes (por ejemplo, aglomerados de más de 2000 nanopartículas) de la suspensión. Los métodos apropiados para este paso son centrifugación (por ejemplo, durante 10 min a 2000 rpm) y filtración (por ejemplo, a través de un filtro plegado con un tamaño de poro de 12-25 μm). En una modalidad especialmente preferida, se llevan a cabo tanto la centrifugación como la filtración. Se ha observado que las nanopartículas predominantemente y completamente recubiertas con alcoxisilano no se sedimentan de la suspensión, por ejemplo, si se centrifugan durante 10 minutos a 15 2000 rpm. En consecuencia, el sobrenadante de la centrifugación y/o el flujo a través de la filtración es/son una suspensión de acuerdo con la invención que muestra/no muestra sedimentación más de un día, preferiblemente una semana, especialmente un mes y, por lo tanto, se puede almacenar durante un largo tiempo.

20 Por otra parte, las nanopartículas recubiertas de forma incompleta se pueden eliminar en gran medida de la suspensión, por ejemplo, por tal centrifugación. Se prefiere tal eliminación de las nanopartículas recubiertas de forma incompleta, puesto que las nanopartículas recubiertas de forma incompleta tienen una menor SAR, lo cual, por lo tanto, reduce el volumen de la SAR de una suspensión.

25 Los pasos de desintegración y, opcionalmente, el paso de eliminación es/son llevados a cabo preferiblemente hasta que los aglomerados de las nanopartículas de metal tienen un tamaño promedio (z promedio), de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, determinado por dispersión de luz. En este contexto, el tamaño promedio se determina en agua de acuerdo con el ejemplo 3. Con esta medida de dispersión de luz, el tamaño de los aglomerados de nanopartículas es determinado - en contraste con el tamaño de las nanopartículas individuales densas en electrones en forma de esfera o cúbicas que se están formando tales aglomerados. El valor de " z promedio" con respecto al tamaño de los aglomerados significa la lectura de la determinación del tamaño de la dispersión de la luz como en el ejemplo 3. Los 30 valores de z promedio superiores a los intervalos previstos conducen a la sedimentación de las nanopartículas y son, por tanto, en general, no apropiados para las aplicaciones previstas de estas nanopartículas. Incluso si la dispersión se puede reconstituir antes de la instilación en un tumor, los aglomerados más grandes pueden conducir a problemas graves, puesto que la dispersión se puede separar parcialmente en solución amortiguadora y los aglomerados mientras pasan a través de la aguja, lo que induce una distribución desigual de las nanopartículas dentro del tejido.

35 En otra modalidad preferida de la invención, la suspensión de aglomerados se concentra a una concentración como mínimo aproximadamente de 2 M, preferiblemente como mínimo aproximadamente de 3 M, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 4 M, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 5 M, y especialmente como mínimo aproximadamente de 6 M, determinado por su contenido de metal. La concentración de metal deseada en la suspensión de acuerdo con esta invención se puede ajustar mediante la evaporación de agua en un evaporador de rotación. Pueden 40 analizarse muestras de suspensión en cuanto al contenido de sólidos y la concentración de metal utilizando el método descrito a continuación (ver, por ejemplo, el Ejemplo 2).

45 Sorprendentemente, se ha encontrado que las nanopartículas en la composición pueden ser concentradas a altas concentraciones de 2 M de contenido de metal y superiores, sin perder su capacidad de uso como dispositivo médico o medicamento. Estas suspensiones altamente concentradas todavía pueden ser infundidas o inyectadas en la rutina diaria y, sobre todo, se pueden almacenar durante meses. Después de la esterilización en autoclave de la suspensión, puede observarse algo de gelificación, lo que, sin embargo, se puede revertir mediante agitación intensa (por ejemplo, durante aproximadamente 12 horas). En comparación con una suspensión con una concentración de metal inferior, estas suspensiones tienen una tasa de absorción específica (SAR) más alta en base a volumen y una alta viscosidad. Sorprendentemente, se ha mostrado para las nanopartículas descritas en el presente documento que la formación de depósito de tales nanopartículas dentro del tejido deseado, por ejemplo, tumor, depende de la concentración de las nanopartículas, en este caso, superiores concentraciones de nanopartículas conducen a la formación de un depósito mejorado. Este resultado fue inesperado, puesto que se puede suponer razonablemente que la concentración de nanopartículas inyectadas se iguala rápidamente para diferentes concentraciones dentro del tejido, de modo que las nanopartículas idénticas en diferentes concentraciones no se comportan de manera diferente.

55 Otro aspecto descrito en el presente documento es una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético que se pueden obtener por un método descrito anteriormente. Como se muestra en los ejemplos a continuación, esta suspensión se puede inyectar en los tumores en la rutina diaria, se mantiene dentro del tejido tumoral y, por lo tanto, puede ser utilizado para la hipertermia y la termoablación.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el recubrimiento con alcoxisilano de acuerdo con esta invención añade a las propiedades de las nanopartículas la capacidad de aglomeración en tal forma que, durante la inyección en el tejido, los aglomerados permanecen en su mayor parte en las proximidades del sitio de inyección, pero todavía son fáciles de manejar. Esto hace que estos aglomerados sean especialmente apropiados para inyección en los tejidos tumorales, por ejemplo, para hipertermia y/o termoablación.

Se describe adicionalmente una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal recubiertas con alcoxisilano magnético, en la que los aglomerados tienen un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, como se determina por la dispersión de luz. La medida del tamaño de las nanopartículas aglomeradas, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 3.

Esta composición que comprende aglomerados está esencialmente libre de solventes orgánicos. "Esencialmente libre de solventes orgánicos" significa que pueden estar presentes pequeñas trazas de solventes orgánicos, por ejemplo, la cantidad de solventes orgánicos es inferior al 5% en volumen, preferiblemente 1% en volumen, más preferiblemente inferior al 0,5% en volumen, especialmente inferior al 0,1% en volumen. Preferiblemente, ningún solvente orgánico se puede detectar en la preparación de nanopartículas de acuerdo con métodos usuales.

Las nanopartículas de metal de tales composiciones son preferiblemente nanopartículas que tienen un núcleo de metal con un tamaño de 5 a 25 nm, preferiblemente con un tamaño de 7 a 20 nm y especialmente con un tamaño de 9 a 15 nm como se determina por microscopía electrónica. Los aglomerados de la suspensión se componen preferiblemente de decenas a cientos de tales nanopartículas individuales, mientras que algunos o muy pocos son aglomerados pequeños de menos de diez nanopartículas como se determina en la microscopía electrónica de transmisión (TEM) - preferiblemente menos de 3 aglomerados de 10 o menos nanopartículas en una imagen de TEM representativa que muestra 700 por 700 nm y por lo menos 1000 nanopartículas. La microscopía electrónica de transmisión de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 6.

A su vez, en una imagen de TEM representativa que muestra 700 por 700 nm y por lo menos 1000 nanopartículas, pueden detectarse menos de 10 nanopartículas individuales, preferiblemente menos de 5 nanopartículas individuales, especialmente una o ninguna nanopartícula individual. Una nanopartícula en este contexto es una nanopartícula densa en electrones, básicamente, en forma esférica o cúbica visible en micrografías electrónicas de transmisión. Una nanopartícula individual es una nanopartícula que no está unida por lo menos a otra nanopartícula.

Preferiblemente, la forma de las nanopartículas individuales está en forma esférica o cúbica. El tamaño y la forma de las nanopartículas se pueden adaptar mediante el ajuste de pH, fuerza iónica, temperatura, naturaleza de las sales (percloratos, cloruros, sulfatos y nitratos), o la proporción de concentración de Fe(II)/Fe(III) (revisado por Mohapatra y Anand, 2010).

Preferiblemente, las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, preferiblemente sales de hierro. La sal de hierro es preferiblemente un óxido de hierro, especialmente magnetita. Las nanopartículas preferidas se pueden obtener por los métodos descritos anteriormente, preferiblemente proporcionando la suspensión de nanopartículas de óxido de hierro por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio.

La composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal magnético recubiertas con alcoxisilano descritas en el presente documento pueden tener un potencial zeta de 25 a 80 mV, preferiblemente de 35 a 70 mV, especialmente de 45 a 60 mV. El potencial zeta de la composición se determina como se describe en el Ejemplo 4 a un pH de 5,2 y a una conductividad de 2,0 ms/cm (cada uno determinado a 25 °C). El potencial zeta es dependiente del recubrimiento exitoso de las nanopartículas ya que depende de los grupos amino de los alcoxisilanos. Potenciales zeta más bajos indican un recubrimiento insuficiente de las nanopartículas. El potencial zeta correcto dentro de los intervalos proporcionados contribuye a las propiedades de las nanopartículas cuando se inyectan en el tejido, es decir, que las nanopartículas inyectadas permanecen en el sitio de inyección o en su proximidad, por ejemplo, dentro del tumor, y no se propagan a los tejidos circundantes, lo que limitaría el campo magnético aplicable y por lo tanto el éxito del tratamiento. Además, el potencial zeta en los intervalos proporcionados asegura la estabilidad coloidal óptima y, por lo tanto, extiende el período de validez de la composición de nanopartículas.

Se describe adicionalmente una composición que comprende aglomerados de nanopartículas de metal magnético recubiertas con alcoxisilano, en el que los aglomerados se suspenden en una solución amortiguadora a base de agua fisiológicamente aceptable. Las soluciones amortiguadoras fisiológicamente aceptables son conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, acetato, citrato, carbonato o fosfato a un pH (a 25 °C) entre 5 y 8, preferiblemente entre 5 y 6, y especialmente entre 5,1 y 5,8 y una conductividad (a 25 °C) de 1,5 a 2,5 ms/cm, preferiblemente de 1,7 a 2,3 ms/cm. La osmolalidad de una suspensión apropiada es de 0,01 a 0,05 Osmol/kg, preferiblemente de 0,02 a 0,04 Osmol/kg. Tales suspensiones están preferiblemente listas para usar como infusiones para el tratamiento sistémico o inyecciones para aplicación intersticial o intratumoral.

La composición de esta invención tiene preferiblemente una concentración de nanopartículas como mínimo aproximadamente de 2 M, preferiblemente como mínimo aproximadamente de 3 M, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 4 M, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 5 M y especialmente como mínimo aproximadamente de 6 M, como se determina por su contenido de metal. Preferiblemente, la concentración de nanopartículas está por debajo de aproximadamente 8 M, puesto que concentraciones demasiado altas, para ciertas aplicaciones, pueden conducir a dificultades durante la inyección debido a la alta viscosidad de la dispersión. Con respecto al hierro, 2 M es igual a 112 mg/ml. La concentración de metal puede ser determinada por fotometría, ciertos complejos de metales, por ejemplo, el hierro se puede determinar después de la transformación en un complejo de fenantrolina de hierro (II) como se describe en el Ejemplo 2.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las nanopartículas en la composición de acuerdo con esta invención pueden ser concentradas a altas concentraciones de 2 M de contenido de metal y superiores, sin perder su capacidad de uso como dispositivo médico o medicamento. Estas suspensiones altamente concentradas todavía pueden ser infundidas o inyectadas en la rutina diaria y, sobre todo, se pueden almacenar durante meses. Después de la esterilización en autoclave de la suspensión se puede observar algo de gelificación que, sin embargo, puede ser revertida mediante agitación intensa (por ejemplo, 12 horas). En comparación con una suspensión con una concentración de metal inferior, estas suspensiones tienen una SAR superior con base en el volumen y una alta viscosidad. Sorprendentemente, se ha mostrado que, para las nanopartículas de la invención, la formación de depósito de tales nanopartículas dentro del tejido deseado, por ejemplo, tumor, depende de la concentración de las nanopartículas, es decir, mayores concentraciones de nanopartículas conducen a la formación de un depósito mejorado. Este resultado fue inesperado, puesto que cabe suponer razonablemente que la concentración de nanopartículas inyectadas se iguale rápidamente para diferentes concentraciones dentro del tejido, de modo que las nanopartículas idénticas en diferentes concentraciones no se comporten de manera diferente.

Como se puede ver en el Ejemplo 9, más nanopartículas podrían ser depositadas dentro del tumor para composiciones altamente concentradas (por ejemplo, 95% de hierro inyectado para una suspensión 6 M frente a 90% para una suspensión de 2 M a 0 días). Este hallazgo es consistente con los resultados de una inferior cantidad de hierro encontrada en el pulmón, el hígado y el bazo para la suspensión 6 M en comparación con una suspensión 2M (por ejemplo, 3% frente a 14% en el día 0). Por lo tanto, se concluye que, cuanto mayor es la concentración, menos nanopartículas entran en la circulación y terminan en otros órganos.

Además, se encontró que el aumento de nanopartículas concentradas de la invención permanecen completamente dentro del tumor dentro de un período de tiempo de 7 días (para suspensión 6 M: 95% en el día 0 frente a 96% en 7 días), mientras que algunas pérdidas de contenido de hierro pueden ser observadas en el mismo período de tiempo para una suspensión de concentración más baja (suspensión 2 M: 90% en el día 0 frente al 86% en el día 7). Este hallazgo es especialmente sorprendente, puesto que cabe esperar que las nanopartículas se diluyan rápidamente durante la inyección en el tejido tumoral y no muestren un comportamiento diferente durante períodos de tiempo más largos.

La composición tiene preferiblemente una viscosidad a una velocidad de cizallamiento de 100/s de igual o más de 0,005 Pa.s, preferiblemente igual o más de 0,01 Pa.s, más preferiblemente igual o más de 0,1 Pa.s, y especialmente igual o más de 1 Pa.s, tal como se determina por reometría rotacional. Reometría rotacional de acuerdo con la presente invención se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 8. La viscosidad aumenta para suspensiones con el aumento de nanopartículas o la concentración de hierro.

La tasa de absorción específica (SAR) de las nanopartículas dentro de la composición puede ser mayor o igual de 2 W/g del metal respectivo (por ejemplo, hierro), preferiblemente mayor o igual a 3 W/g del metal respectivo y especialmente 4 a 50 W/g de metal respectivo, determinado a una intensidad de campo magnético de 3,5 kA m y una frecuencia de 100 kHz de acuerdo con el método descrito por Jordan et al. (1993). Generalmente, se prefieren altos valores de SAR, puesto que, en consecuencia, temperaturas más altas se pueden lograr durante la exposición a un campo magnético alterno. Si el valor de SAR de las nanopartículas es demasiado bajo, es decir, inferior a los números proporcionados, es probable que después de la exposición a un campo magnético alterno, las temperaturas alcanzadas en todo el tumor sean demasiado bajas para alcanzar un efecto terapéutico.

Se describe adicionalmente una composición de acuerdo con esta invención, en donde, durante la inyección de la composición en un modelo de tumor isogénico en o después del día 7, después de la inyección por lo menos 90%, preferiblemente por lo menos 93%, más preferiblemente por lo menos 95%, y especialmente por lo menos 98% de metal aplicado permanece dentro del tumor inyectado. Un modelo de tumor isogénico puede ser un modelo de tumor, en donde las células tumorales, que se utilizan para inducir un tumor, se corresponden genéticamente al animal huésped. Por ejemplo, la línea celular de carcinoma mamario C3H RS1 se utiliza para generar tumores en ratones de la cepa C3H-HeN. El metal restante en el tumor se puede determinar mediante la medición de la recuperación de metal utilizando espectrometría, por ejemplo, mediante un espectrómetro de Tecan Infinite M 200.

Se describe adicionalmente una composición que se puede obtener mediante cualquiera de los métodos de la invención.

Se describe adicionalmente un dispositivo médico que comprende una suspensión o una composición de acuerdo con esta invención. Puesto que las nanopartículas magnéticas ejercen su efecto terapéutico durante la exposición a un campo magnético alterno a través de la generación de calor como un modo de acción físico y no interactúan directamente con el metabolismo del paciente, estas nanopartículas se clasifican en múltiples jurisdicciones como dispositivos médicos. Sin embargo, se pueden utilizar como herramientas poderosas para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales y otras enfermedades a través de la hipertermia y/o termoablación, en donde las células tienen mal funcionamiento en una cierta región del cuerpo.

Ejemplos de tales otras enfermedades que se pueden tratar de acuerdo con esta invención son reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas. Enfermedades tumorales que pueden ser tratadas con las nanopartículas son preferiblemente tumores sólidos, especialmente tumores locales o localmente avanzados o enfermedades tumorales sistémicas que causan problemas locales, tales como metástasis inoperable. Ejemplos son los tumores cerebrales, por ejemplo, glioblastoma y astrocitoma, metástasis cerebrales, cáncer de próstata, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, carcinoma de células renales, carcinoma de ovario, carcinoma de cuello uterino, sarcoma, carcinoma de células basales y melanoma.

Se describe adicionalmente un medicamento que comprende una suspensión o una composición de acuerdo con esta invención. La suspensión o la composición de la invención se pueden formular con los productos farmacéuticos activos, tales como agentes antineoplásicos, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos (que se pueden agrupar en agentes alquilantes, antibióticos antineoplásicos, antimetabolitos, derivados de origen natural), hormonas/ factores de crecimiento o análogos o inhibidores de hormonas/ factores de crecimiento, inhibidores de transducción de señal y agentes terapéuticos inmunitarios. Agentes farmacéuticos apropiados se enumeran, por ejemplo, en Waldoefner y Stief (2011, párrafos [0096] a [0102]). De acuerdo con ello, es un aspecto que las nanopartículas se combinan con estos productos farmacéuticos activos.

Se describe adicionalmente una suspensión o a una composición para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas como se describió anteriormente y a continuación en un paciente tal como se define anteriormente y a continuación.

Se describe adicionalmente un método de tratar o prevenir una enfermedad proliferativa, cáncer, tumores, reumatismo, artritis, artrosis e infecciones bacterianas que comprenden el paso de administrar la suspensión o la composición a un paciente humano o animal como se describió anteriormente y a continuación.

Preferiblemente, la suspensión o composición para su uso descrita en el presente documento o el método de tratar o prevenir enfermedades de acuerdo con esta invención incluye además exponer al paciente a un campo magnético alterno. Por lo general, el campo magnético alterno se aplica horas o días después de la inyección de la suspensión o la composición en la región objetivo, por ejemplo, tumor, del paciente (Johannsen et al., 2007; Thiesen y Jordan, 2008; Maier-Hauff et al., 2011).

En analogía a Jordan et al. (2008), la suspensión o composiciones pueden utilizarse además en un método para aumentar la actividad de un agente antineoplásico, que comprende los pasos de administrar a un paciente que lo requiera una composición farmacéutica que comprende aglomerados de nanopartículas como se describe en el presente documento y en un paso separado administrar por lo menos un agente antineoplásico junto con por lo menos un excipiente, vehículo y/o solvente farmacéuticamente aceptable. Las dos administraciones pueden ser al mismo tiempo o una después de la otra (primero, nanopartículas; segundo, agente antineoplásico o vice versa), sin embargo, de tal manera que las nanopartículas y agente antineoplásico están presentes al mismo tiempo dentro del cuerpo del paciente con el fin de ser capaz de actuar en conjunto y mejorar el efecto terapéutico del otro. Considerando que, los aglomerados de nanopartículas permanecen dentro del tejido durante meses o años dentro del área objetivo y pueden generar calor durante la exposición a un campo magnético alterno, un agente antineoplásico administrado típicamente actúa durante horas o días. "Actuar juntos" en este contexto significa, por lo tanto, que todavía están presentes en el tejido suficientes niveles farmacológicamente activos del agente antineoplásico. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención son nanopartículas de la presente invención para uso en un método para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades tumorales, en donde las nanopartículas se administran junto con agentes antineoplásico de tal manera que las nanopartículas y el agente antineoplásico están presentes al mismo tiempo dentro del cuerpo del paciente.

Los aglomerados de nanopartículas pueden ser complejados o acoplados covalentemente a un agente farmacéutico activo o a un agente de dirección tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o ligandos tales como los conocidos en el campo. Por ejemplo, el acoplamiento de los productos farmacéuticos y/o ligandos activos a las nanopartículas se describe en Jordan et al. (2008), Gao et al. (2011), Waldoefner y Stief (2011) e Ivkov et al. (2005).

Otras formas farmacéuticas o dispositivos médicos apropiados de los aglomerados de nanopartículas son suspensiones en polvo, por ejemplo, para inhalación o liofilizados, que pueden ser reconstituidos antes de la infusión o inyección, o implantes que comprenden aglomerados de nanopartículas, por ejemplo, dispositivos sólidos o gelatinosos médicos, esponjas o películas como, por ejemplo, se describen además en Jordan (2009).

Generalmente, los medicamentos o dispositivos médicos pueden ser fácilmente combinados con terapias convencionales que se utilizan para el tratamiento o profilaxis respectivos de la enfermedad, tal como quimioterapia o radiación. Se pueden utilizar ya sea para aumentar la eficacia del tratamiento individual como para reducir los efectos secundarios de la terapia convencional por su menor dosis si se combina con los medicamentos o dispositivos médicos.

A la luz de la discusión general anterior, las figuras y los ejemplos específicos presentados a continuación son sólo ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención. Otras configuraciones genéricas y específicas serán evidentes para las personas experimentadas en la técnica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Micrografía electrónica de transmisión de una suspensión 2 M de nanopartículas de óxido de hierro magnético fabricada de acuerdo con el Ejemplo 1.

Figura 2: La viscosidad de las tres diferentes preparaciones de nanopartículas de óxido de hierro de acuerdo con el Ejemplo 1 ha sido determinada por reometría rotacional de acuerdo con el Ejemplo 8. La viscosidad de cizallamiento en Pa.s se representa en dependencia de la velocidad de cizallamiento en s para AS1 (Fe 6 M) [rombos rellenos], AS2 (Fe 3 M) [círculos huecos] y AS1 (Fe 2 M) [cuadrados rellenos].

Figura 3: La SAR de tres preparaciones diferentes de nanopartículas de acuerdo con el Ejemplo 1 se ha determinado de acuerdo con el Ejemplo 5. La SAR en W/g de Fe se representa en la dependencia de la intensidad del campo magnético alterno en kA/m para AS1 (Fe 6 M) [rombos rellenos], AS2 (Fe 3 M) [círculos huecos] y AS1 (Fe 2 M) [cuadrados rellenos].

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

1. Fabricación de nanopartículas de óxido de hierro magnético recubiertas

1.1. Por medio de la precipitación de óxido de hierro a partir de soluciones de sal de hierro (AS1 y AS2)

Precipitación y lavado: NaOH se pesa en un matraz, se disuelve en agua purificada a una concentración de 2,13 M y es posteriormente enfriada a 25 °C. Cloruro de Fe (III) y cloruro de Fe (II) (proporción 2:1) se introducen en una botella de vidrio y se disuelven en agua purificada para obtener una solución de cloruro de Fe (III) 0,48 M/ cloruro de Fe (II) 0,24 M. La solución de cloruro de hierro se vierte en la solución de NaOH y se mezcla durante un período de aproximadamente 53 min, mientras la temperatura se mantiene constante a 25 °C. Las nanopartículas generadas se dejan sedimentar y se elimina el sobrenadante. Las nanopartículas se lavan con agua desgasificada hasta que el sobrenadante alcanza una conductividad de < 5 ms/cm.

Opcionalmente, la solución de NaOH se vierte en la solución de cloruro de hierro (en lugar de vice versa) durante un período de aproximadamente 39 min a 15 °C. Esta modificación del proceso se ha realizado para las nanopartículas de AS2.

Recubrimiento y desintegración

La suspensión de nanopartículas anterior se ajusta con HCl diluido hasta que el pH está entre 2,5 y 3,0. Después, el matraz se coloca en un baño ultrasónico y se trata con ultrasonido a 45 kHz por 1 hora mientras que se agita. Ahora durante un tiempo de 90 min 3-(2-aminoetilamino)-propil trimetoxisilano (Fluka, 48 ml por 1,2 l de suspensión de nanopartículas) se agrega gota a gota, mientras que el pH se mantiene por debajo de un umbral de 5,5 mediante la adición de gotas de ácido acético, pero el pH no deberá ser más bajo que 5,0. Después de este paso, el pH se ajusta a 4,65 con HCl diluido y la suspensión se trata adicionalmente con ultrasonido durante 23 horas. Las partículas fabricadas de acuerdo con este protocolo (sin los pasos opcionales) se conocen como nanopartículas AS1.

Opcionalmente, las nanopartículas son tratadas con H₂O₂ durante dos días antes del recubrimiento con el fin de conseguir una dispersión más fina de las nanopartículas y una mejor estabilidad coloidal. Además, se puede utilizar H₂O₂ con el fin de oxidar completamente el Fe bajo condiciones controladas a Fe₂O₃. Como resultado, se pueden realizar reacciones posteriores en ausencia de un gas de protección (por ejemplo, argón). Este paso opcional se ha realizado para las nanopartículas AS2 de arriba.

Diálisis: La suspensión se purificó con un cartucho de hemodiálisis (Fresenius F8 HPS) contra agua ultrapura desgasificada hasta que se alcanza una conductividad de 400 µs/cm.

Centrifugación y concentración: La mitad de la suspensión resultante se introduce en una cubeta centrífuga y se centrifuga durante 10 min a 2000 rpm. A continuación, el sobrenadante se filtra a través de un filtro plegado (12-25 µm) en una botella de vidrio, que ha sido previamente enjuagada durante 5 min con argón. Este procedimiento se repite de forma idéntica con la segunda mitad de la suspensión. Después, la suspensión de nanopartículas se concentra con un evaporador de rotación a la concentración de Fe deseada (por ejemplo, 112 mg/ml de Fe es igual a Fe 2 M, 168 mg/ml de Fe igual a Fe 3 M o 335 mg/ml de Fe es igual a Fe 6 M). Puede analizarse el contenido de sólidos y la concentración de Fe en muestras de nanopartículas.

1.2. Por medio de la descomposición térmica del complejo de hierro (AS4 y AS5)

Se produjeron partículas AS4 análogamente a los métodos descritos en Waldoefher y Stief (2011). En resumen, se combinaron cloruro de hierro (III), acetato de sodio, diaminohexano y etilenglicol en un matraz de tres bocas y se agitaron hasta que se obtuvo una solución homogénea. A continuación, la mezcla se calentó fuertemente hasta cerca de la ebullición y se sometió a reflujo durante cinco horas. Después del lavado y la recolección de las partículas por centrifugación, las partículas secas se mezclaron con óxido de trimetileno en etilenglicol y se calentaron a 130 °C y se mantuvieron durante 2 horas. A continuación, la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora. Para el siguiente paso de oxidación, las partículas lavadas se volvieron a suspender en ácido nítrico y se trataron con nitruro de hierro. Entonces, después del lavado y recolección las partículas por centrifugación, las partículas se revistieron con tetraalcoxilano con el fin de formar una cubierta gruesa de SiO₂. Las partículas resultantes se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en agua. El recubrimiento final, la desintegración y la purificación (diálisis, centrifugación y concentración) se pueden hacer de la misma manera como se describió anteriormente para las partículas AS1.

Las partículas AS5 se produjeron análogamente a los métodos descritos por Guardia et al. (Guardia et al., 2010a; Guardia et al., 2010b; Guardia et al., 2012).

Una solución de acetilacetato de hierro (III) y ácido decanoico en dibencil éter se calienta rápidamente hasta 200 °C bajo agitación. A continuación, la mezcla se agitó durante 2 horas a esta temperatura y se calentó durante 15 min a 298 °C. Esta temperatura se mantuvo durante una hora más. Finalmente, la suspensión se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

Entonces, se agregó acetona a la mezcla y el precipitado se secó al aire. Las partículas se volvieron a suspender en agua. El recubrimiento final, la desintegración y la purificación se pueden realizar de la misma manera como se describió anteriormente para las partículas AS1.

2. Concentración de hierro/Determinación del contenido de sólidos

La determinación de la concentración de hierro dentro de una suspensión se basa en la medición fotométrica de la extinción de un complejo de fenantrolina de hierro (II). El complejo es generado por la extracción de las nanopartículas con ácido clorhídrico hasta que la extracción es completa, como se determina por inspección visual. Todo el hierro contenido se reduce a hierro (II) usando hidrocloreto de hidroxilamina y se transforma en el complejo de fenantrolina en ácido acético/solución amortiguadora de acetato. La extinción del complejo se determina a 513 nm utilizando un Shimadzu UV-1700 Pharmaspec contra sulfato de etilendiamonio de hierro (II) estándar (Merck, Darmstadt).

El contenido de sólidos de una suspensión se determina mediante pesado, por ejemplo, 1 ml de la suspensión antes y después de la evaporación del solvente (por ejemplo, agua).

3. Medición del tamaño de la partícula

Para medir el tamaño promedio de las nanopartículas, se utiliza un procedimiento de dispersión de la luz para determinar el tamaño hidrodinámico de la preparación de nanopartículas (por ejemplo, Malvern Zetasizer 3000 HSA o Malvern Zetasizer Nano ZS). El parámetro principal es el valor promedio z, que se mide por la intensidad de la dispersión. Por lo tanto, en caso de una distribución polidispersa, las nanopartículas más grandes pesan más que las más pequeñas. Además, este método determina el tamaño promedio de los aglomerados de nanopartículas y no el tamaño de las nanopartículas individuales o primarias.

Principio: Si las nanopartículas o moléculas están iluminadas con un láser, la intensidad de la luz dispersada fluctúa a una velocidad que depende del tamaño de la nanopartícula/aglomerados puesto que las nanopartículas más pequeñas son “eliminadas” adicionalmente por las moléculas de disolvente y se mueven más rápidamente. El análisis de estas fluctuaciones de intensidad produce la velocidad del movimiento browniano y, por lo tanto, el tamaño de las nanopartículas utilizando la relación de Stokes-Einstein.

Procedimiento: Una pequeña parte de la sustancia de ensayo se diluye dependiente de su concentración (1:1000 hasta 1:3000). Una muestra de la suspensión diluida se coloca en el dispositivo de medición y se trata de acuerdo con las recomendaciones de Malvern Zetasizer 3000 HSA.

4. Medición del potencial zeta

5 Para medir el potencial zeta de las nanopartículas, una muestra se agitó con vórtex durante 30 s. Se preparan 75 ml de una dilución 1:1000 de la solución con una concentración de aproximadamente 0,11 mg/ml para Fe (u otro metal) en agua ultrapura y se tratan durante 15 min con ultrasonido. Se inyectan 20 ml de la solución en la célula de medición de Malvern Zetasizer 3000 HSA (o Malvern Zetasizer Nano ZS) y se miden de acuerdo con las recomendaciones de la fabricación. El pH de la solución se determina con un medidor de pH separado.

5. Medición de SAR

10 La SAR de las muestras del Ejemplo 1 se determinó de acuerdo con el método desarrollado por Jordan et al. (1993) a una frecuencia de 100 kHz y una intensidad de campo de hasta 3,5 kA/m. Los resultados para 3,5 kA/m e intensidades de campo superiores se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Tasa de absorción específica

	Intensidad de campo en W/g a 100 kHz	SAR
AS1 112 mg/ml de Fe	3,5	3,5
AS1 112 mg/ml de Fe	7,5	9,45
AS2 168 mg/ml de Fe	3,5	4,0
AS2 168 mg/ml de Fe	6,0	8,56
AS1 335 mg/ml de Fe	6,0	7,22
AS1 112 mg/ml de Fe	3,0	4,02
AS1 112 mg/ml de Fe	4,0	15,69
AS1 112 mg/ml de Fe	6,0	11,99

Los promedios de SAR de varias series de fabricación de nanopartículas de AS1 y AS2 de diferentes intensidades de campo magnéticos alternos se muestran en la Figura 3.

6. Microscopia electrónica de transmisión

15 La microscopia electrónica de las nanopartículas se puede hacer mediante análisis de TEM en analogía con el método descrito por Jordan et al. (1996, página 712, 3.2.2).

20 Una suspensión 2 M de nanopartículas de óxido de hierro magnético fabricada de acuerdo con el Ejemplo 1 ha sido analizada por TEM. La micrografía resultante se muestra en la Figura 1. En la micrografía, se pueden ver grandes aglomerados de nanopartículas (una nanopartícula individual indicada por una flecha). No se pueden observar nanopartículas individuales dentro del área representada - todas las nanopartículas están unidas entre sí.

7. Especificaciones de la suspensión

Una serie de producción de acuerdo con el ejemplo 1 conduce a las especificaciones físicas/químicas como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Especificaciones de una carga representativa

	AS1	AS4	AS5
Tamaño de la partícula (promedio z)	89 nm	179,6	180,8 nm
Potencial zeta	53,5 mV	47,8 mV	42,5 mV
Conductividad (25 °C)	2,16 ms/cm	0,90 ms/cm	--
pH (25 °C)	5,28	4,38	--
Osmolalidad	0,03 Osmol/kg	0,08 Osmol/kg	--
SAR (a 100 kHz, a intensidad del campo dada)	10 W/g Fe (7,5 kA/m)	14 W/g Fe (4 kA/m)	12 W/g Fe (6 kA/m)
Contenido del metal total (Fe)	15% por peso	18% por peso	--
Concentración (Fe)	1,99 mol/l	1,70 mol/l	1,88 mol/l

8. Reometría de rotación/Medición de la viscosidad

La viscosidad de las muestras de nanopartículas se determinó por servicios de caracterización de materiales Malvern usando reometría de rotación a 20 °C, en donde la viscosidad de cizallamiento (en Pa.s) se determinó en dependencia de la velocidad de cizallamiento (de 7 a 1500/s). Los resultados para preparaciones de nanopartículas de acuerdo con el Ejemplo 1 se muestran en la Figura 2.

9. Formación de depósitos de fluidos magnéticos *in vivo*

Se inyectaron 1×10^6 células tumorales de la línea celular de carcinoma mamario C3H RSI en la extremidad posterior derecha de los ratones de la cepa C3H-HeN (Harlan Laboratories, Borchen). Una vez que los tumores inducidos tenían un volumen de 0,57-0,85 cm³, los animales fueron asignados al azar (15 animales por grupo) y los tumores de la extremidad posterior derecha fueron inyectados con el fluido magnético del Ejemplo 1 que tiene una concentración de Fe de 112 o 335 mg/ml. El contenido exacto del volumen de inyección se determinó pesando la jeringa de inyección antes y después de la inyección y calculando la diferencia (en promedio, 31 μ l \pm 5,8 μ l).

El contenido de Fe total de tejido/tumor de los ratones se determinó después de 0 o 7 días de medición UV-vis a 565 nm utilizando la prueba de Spektroquant 14761 (Merck, Darmstadt) y un Cary 50 (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA) y un espectrómetro Tecan Infinite M 200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suiza). El contenido de Fe aplicado inicialmente se determinó restando del contenido de Fe total del contenido del tejido/tumor inicial del tejido (determinado midiendo el contenido de Fe de la pata izquierda no inoculada) y la pérdida de fluido magnético durante la inoculación, que fue absorbida por el hisopo utilizado. La recuperación de Fe (promedio de 15 tumores por grupo) se calculó como el contenido total de Fe, dividido por el contenido de Fe aplicado inicialmente.

Tabla 3: Recuperación de Fe determinado por Cary 50

Cary		Recuperación de Fe Tumor [%]	Recuperación de Fe Pulmón/hígado/bazo [%]	Recuperación de Fe Tumor/pulmón/hígado/ bazo [%]
112 mg/ml Fe	día 0	90	14	104
	día 7	86	10	96
335 mg/ml Fe	día 0	95	3	98
	día 7	96	3	99

Tabla 4: Recuperación de Fe determinado por Tecan Infinite M 200

Tecan		Recuperación de Fe Tumor [%]	Recuperación de Fe Pulmón/hígado/bazo [%]	Recuperación de Fe Tumor/pulmón/hígado/ bazo [%]
112 mg/ml Fe	día 0	95	16	111
	día 7	93	13	106
335 mg/ml Fe	día 0	98	4	102
	día 7	98	4	102

Considerando el contenido inicial de Fe (determinado en la pata izquierda) y las pérdidas por el volumen de inoculación más pequeño de los fluidos magnéticos, las tasas de recuperación de Fe total en promedio para los cuatro grupos fueron del 99% para Cary 50 y 104% para Tecan Infinite M 200. En general, las cifras de recuperación eran más altas usando Tecan Infinite M 200 (Tabla 4) frente a Cary 50 (Tabla 3).

Comparando las tasas de recuperación de Fe entre la formulación de 112 mg/ml Fe y la formulación de 335 mg/ml de Fe, ambas determinaciones revelaron una tendencia que en el día 0 más nanopartículas de Fe fueron retenidas dentro del tumor para la formulación de 335 mg/ml (95% frente a 90% determinado por Cary, y 98% frente a 95% determinado por Tecan). Por otro lado, cantidades de nanopartículas de Fe encontradas en otros tejidos (pulmón, hígado y bazo) en el día 0 fueron mucho más altas para la formulación de 112 mg/ml de Fe (14%/16% para 112 mg/ml frente a 3% para 335 mg/ml). Por lo tanto, se puede concluir que más nanopartículas de Fe son expulsadas del tumor durante y potencialmente inmediatamente después de la aplicación dentro del día 0 para la formulación de concentración inferior en comparación con la formulación de concentración superior.

Con el fin de determinar la proporción de Fe que queda después de 7 días dentro del tumor en comparación con Fe que efectivamente se aplica al tumor en el día 0, las tasas de recuperación de Fe en el día 0 se dividieron por las tasas de recuperación de Fe en el día 7 y se promediaron entre las determinaciones por el Cary 50 y Tecan Infinite M 200 (resultados

mostrados en la Tabla 5). Del mismo modo, la tasa de Fe que se acumuló en el día 0 en el pulmón, hígado y bazo se analizó mediante la comparación de la cantidad a Fe todavía presente dentro de estos órganos en el día 7.

Tabla 5: Fe restante dentro del tumor/órganos después de 7 días (proporción entre los días 0 y 7, promediado entre Cary y Tecan)

	Fe restante Tumor [%]	Fe restante Pulmón/hígado/bazo [%]
112 mg/ml Fe	97%	75%
335 mg/ml Fe	101%	100%

5

Mientras que para la formulación de 112 mg/ml de Fe, hubo una pérdida adicional de aproximadamente 3% de Fe del día 0 al día 7, el contenido de Fe para la formulación de 335 mg/ml de Fe se mantuvo constante durante este periodo de tiempo. Curiosamente, aproximadamente $\frac{1}{4}$ parte del Fe detectado en pulmón, el hígado y el bazo para la formulación de 112 mg/ml de Fe desapareció en una semana, mientras que todo el Fe de la formulación de 335 mg/ml detectada en estos órganos en el día 0 permaneció allí hasta el día 7 (aunque hay que considerar que las cantidades totales de Fe encontradas en estos órganos para la formulación de 335 mg/ml de Fe fueron, en total, solamente $\frac{1}{4}$ parte de la cantidad de Fe encontrada en estos órganos para la formulación de 112 mg/ml de Fe, ver la Tabla 3 y la Tabla 4, columna “recuperación de Fe pulmón/hígado/bazo”).

10

Por lo tanto, la formulación de nanopartículas de concentración superior muestra adicionalmente una tasa de retención mejorada de las nanopartículas dentro del tumor durante un periodo de 7 días, lo que es de gran importancia, si los pacientes son sometidos a múltiples tratamientos con un campo magnético durante semanas o meses.

15

Bibliografía

- Gao, J., et al. (2011). WO 201 1/082796.
- Guardia, P., et al. (2012). ACS Nano 6(4): 3080-91.
- Guardia, P., et al. (2010 a). Chem Commun (Camb) 46(33): 6108-10.
- Guardia, P., et al. (2010 b). Langmuir 26(8): 5843-7.
- Gupta, A. K. and M. Gupta (2005). Biomaterials. 26(18): 3995-4021.
- Ivkov, R., et al. (2005). Therapy via Targeted Delivery of Nanoscale Particles. US 2005/0090732.
- Johannsen, M, et al. (2007). Eur Urol. 52(6): 1653-61. Epub 2006 Nov 17.
- Jordan, A. (2009). Implantable Products comprising Nanoparticles. WO 2009/100716.
- Jordan, A., et al. (2008). Nanoparticle/Active Ingredient Conjugates. US 2008/0268061.
- Jordan, A., et al. (2008). Method of Carrying Therapeutic Substances into Cells. US 2008/0187595. Jordan, A., et al. (1993). Int J Hyperthermia. 9(1): 51-68.
- Jordan, A., et al. (1996). Int J Hyperthermia. 12(6): 705-22.
- Lesniak, C, et al. (1997). US 6,183,658.
- Maier-Hauff, K., et al. (201 1). J Neurooncol 103(2): 317-24.
- Massart, R. (1981). IEEE Trans. Magn. 17(2): 1247-48.
- Mohapatra, M. and S. Anand (2010). Int J of Engineering, Science and Technology. 2(8): 127-46.
- Moroz, P., et al. (2002). Int J Hyperthermia. 18(4): 267-84.
- Ruefenacht, D., et al. (2006). WO 2006/125452.

35

Schnoor, A., et al. (2010). *Chemie Ingenieur Technik* 82(3): 317-26.

Thiesen, B. and A. Jordan (2008). *Int J Hyperthermia*. 24(6): 467-74.

Waldoefher, N. and K. Stief (201 1). *Magnetic Transducers*. US 201 1/0052609.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir una suspensión de aglomerados de nanopartículas de metal magnéticas recubiertas con alcoxisilano, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de metal magnético se incuba con alcoxisilano, **caracterizado porque** la incubación se realiza esencialmente en ausencia de solvente orgánico añadido, en donde el alcoxisilano es trialcoxisilano y en donde se añaden $0,3$ a $0,6 \times 10^{-3}$ mol de trialcoxisilano por $0,9$ mol de metal.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las nanopartículas de metal comprenden hierro, compuestos de complejo de hierro, compuestos de carbonilo de hierro o sales de hierro, preferiblemente sales de hierro, en particular, en donde la sal de hierro es un óxido de hierro, preferiblemente magnetita y/o maghemita.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde una suspensión acuosa de nanopartículas de óxido de hierro es
 - 10 a) proporcionada por precipitación de una solución que contiene una mezcla de cloruro de hierro (III) y cloruro de hierro (II) con hidróxido de sodio, o
 - b) por descomposición térmica de la sal de hierro o el compuesto de complejo de hierro.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las nanopartículas de metal magnéticas son tratadas con H_2O_2 antes de la incubación.
- 15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trialcoxisilano se ha seleccionado del grupo que consiste en 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano, 3-aminopropiltriethoxisilano, trimetoxisililpropil-dietilentriammina y N-(6-amino-hexil)-3-aminopropiltrimetoxisilano, especialmente 3-(2-aminoetilamino)-propil-trimetoxisilano.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se añaden $0,4$ a $0,5 \times 10^{-3}$ mol, preferiblemente $0,43$ hasta $0,45 \times 10^{-3}$ mol de trialcoxisilano por $0,9$ mol de metal.
- 20 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la incubación se realiza a un pH entre 2 y 6.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las nanopartículas de metal magnéticas son desintegradas antes de la incubación con alcoxisilano.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además el paso de desintegrar
 - 25 las nanopartículas magnéticas después de comenzar la incubación con alcoxisilano.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además el paso de eliminar las nanopartículas revestidas incompletamente.
11. El método de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 10, en donde los aglomerados son desintegrados hasta que se logra
 - 30 un tamaño promedio de 30 a 450 nm, preferiblemente de 50 a 350 nm y especialmente de 70 a 300 nm, determinado mediante dispersión de luz.
12. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11, en donde la suspensión de aglomerados se concentra a una concentración como mínimo aproximadamente de 2 M, preferiblemente como mínimo aproximadamente de 3 M, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 4 M, incluso más preferiblemente como mínimo aproximadamente de 5 M, y especialmente como mínimo aproximadamente de 6 M, determinado por su contenido de metal.

Figura 1

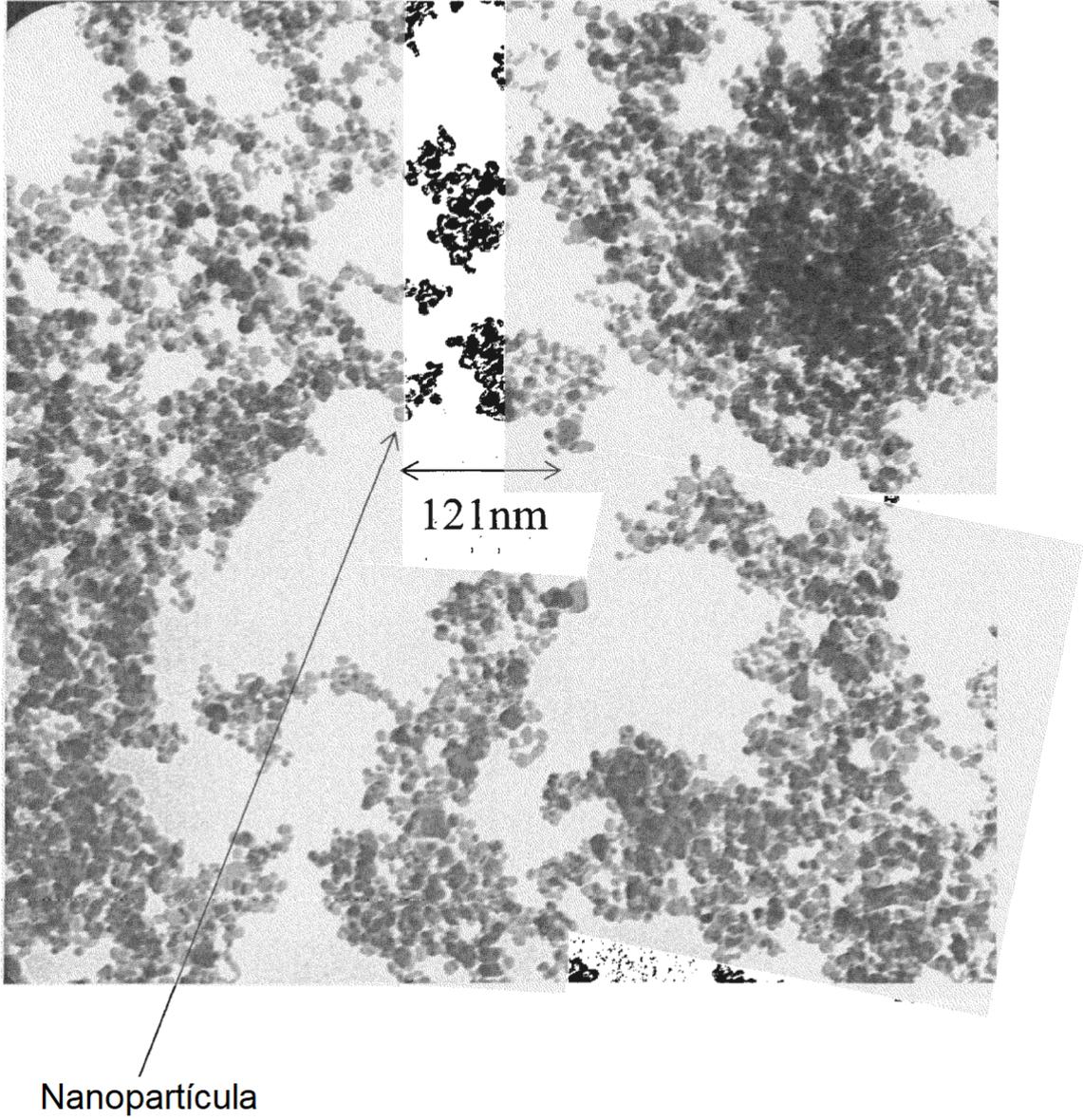


Figura 2

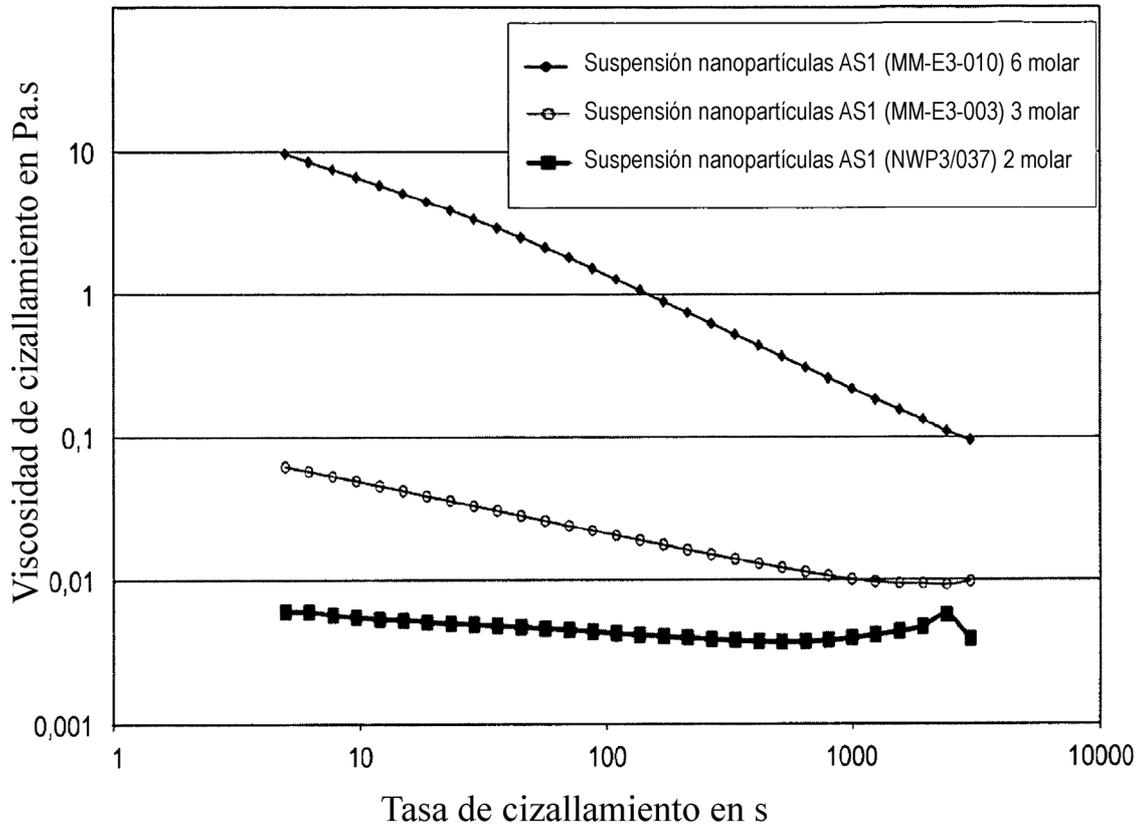


Figura 3

