

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 817 748**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/24** (2009.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2016 PCT/US2016/012684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16112314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2016 E 16735490 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3242670**

54 Título: **Formulaciones no tóxicas de nanopartículas radioluminiscentes para usar como agentes radiosensibilizantes del cáncer**

30 Prioridad:

**08.01.2015 US 201562101275 P**

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

**08.04.2021**

73 Titular/es:

**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)  
Office of Technology Commercialization 1281  
Win Hentschel Boulevard  
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**WON, YOU-YEON y  
LEE, JAEWON**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 817 748 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

Formulaciones no tóxicas de nanopartículas radioluminiscentes para usar como agentes radiosensibilizantes del cáncer

## Campo de la invención

- 5 La invención se refiere generalmente a una formulación en la que partículas de tungstato metálico están encapsuladas dentro de revestimientos poliméricos biocompatibles dirigidos a células enfermas.

## Antecedentes

10 Aunque la radioterapia es un componente clave del tratamiento contra el cáncer, existen efectos secundarios significativos. Por tanto, existe un gran interés en el desarrollo de medios para conseguir los beneficios de la radioterapia con efectos negativos reducidos. Un área activa actual de investigación intenta desarrollar agentes químicos (denominados "radiosensibilizantes") que hacen que las células cancerosas sean más fáciles de destruir con menos radiación. Sin embargo, los métodos actuales de radiosensibilización (tales como fármacos antineoplásicos o nanopartículas fotoeléctricas) no son satisfactorios debido a su toxicidad o ineficacia.

15 Recientemente, se ha inventado una tecnología completamente nueva, denominada "Terapia de radioluminiscencia (RLT)" para afrontar las limitaciones de los métodos de radiosensibilización anteriores. Esta tecnología se basa en un nuevo tipo de radiosensibilizante, concretamente, las "Partículas radioluminiscentes (RLP)". Los ejemplos más prometedores de dichos materiales incluyen tungstatos metálicos y molibdatos metálicos. Estas RLP producen luz UV con radiación fotónica de alta energía. Bajo la influencia de las RLP, la radiación destruye células cancerosas significativamente mejor; por tanto, se puede conseguir el mismo efecto terapéutico con menos radiación. Al usar  
20 menos radiación se pueden reducir los efectos secundarios de la radioterapia en los pacientes.

Estas aplicaciones, sin embargo, requieren el desarrollo de formulaciones de nanopartículas (NP) que sean adecuadas para aplicaciones *in vivo*; principalmente, las nanopartículas formuladas deben ser suficientemente pequeñas, química y biológicamente inertes, y estables frente a la agregación en condiciones fisiológicas. La presente invención demuestra uno de dichos métodos de formulación, en el que nanopartículas radioluminiscentes se encapsulan en revestimientos de copolímeros en bloque biocompatibles.  
25

El documento US5595724 divulga la preparación de una composición diagnóstica de tungstato de calcio. Las partículas de tungstato de calcio se revisten con un agente de estabilización convencional, tal como albúmina.

## Sumario de la invención

30 En un aspecto, la presente invención reivindicada proporciona una formulación, como se define en la reivindicación 1. La formulación comprende una partícula cristalina o agregado de partículas encapsulado dentro de un copolímero en bloque anfifílico biocompatible que comprende poli(etilenglicol-bloque-acrilato *den*-butilo) (PEG-PnBA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA), en donde dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio ( $\text{CaWO}_4$ ). Puede ser que la partícula sea un material compuesto que comprenda (i)  $\text{CaWO}_4$  y (ii) otro compuesto inorgánico u orgánico biocompatible.

35 En otro aspecto más, la presente invención reivindicada proporciona una partícula radioluminiscente encapsulada en polímero, como se define en la reivindicación 6. Dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio ( $\text{CaWO}_4$ ) y el polímero es un copolímero en bloque anfifílico biocompatible que comprende poli(etilenglicol-bloque-acrilato *den*-butilo) (PEG-PnBA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA).

40 Puede ser que la dimensión media más grande de dicho material de partícula esté en el intervalo entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50.000 nm en su estado sin agregar. En otro aspecto más, la dimensión media más grande de dicho agregado de partícula está comprendida entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 500.000 nm. En otro aspecto más, el diámetro medio de dicha partícula o agregado de partícula está comprendido entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm.

45 Puede ser que dicha partícula o dicho material de revestimiento esté funcionalizado con un agente diana específico de células enfermas en seres humanos o animales. Puede ser que las células enfermas sean células cancerosas.

Puede ser que el diámetro medio de dicho material en forma de partículas esté en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y 1.000 nm. Puede ser que el diámetro medio de dicha partícula esté comprendido entre aproximadamente 1 y 10  $\mu\text{m}$ . Puede ser que el diámetro medio de dicha de partícula está en el intervalo entre aproximadamente 1 y 200 nm. Puede ser que la partícula encapsulada en polímero esté funcionalizada o conjugada  
50 con un agente diana específico de un cáncer. Puede ser que el agente diana sea una molécula biológica que tenga

afinidad específica por dicho cáncer con el fin de potenciar la administración de dichas partículas encapsuladas en polímero a células tumorales. Puede ser que la partícula esté funcionalizada con polietilenglicol (PEG), poli(ácido D,L-láctico-aleat-ácido glicólico) (PLGA), o una de sus combinaciones.

- 5 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los ejemplos y las figuras. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a modo ilustrativo, ya que diversos cambios y modificaciones comprendidos en el alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

- 10 **Figura 1.** Diagrama de bandas de energía que explica las transiciones moleculares de electrones asociadas con los procesos de fotoluminiscencia y radioluminiscencia de CWO
- Figura 2.** Modelos XRD de B-CWO, L-CWO, M-CWO y S-CWO en comparación con el patrón de difracción convencional del CWO masivo (PDF n.º 07-0210).
- 15 **Figuras 3A - 3I.** Imágenes de TEM a bajo aumento representativas de (Figura 3A) L-CWO, (Figura 3D) M-CWO y (Figura 3G) S-CWO. Imágenes de TEM de alta resolución de (Figura 3B) L-CWO, (Figura 3E) M-CWO y (Figura 3H) S-CWO. Se muestran en la (Figura 3C), (Figura 3F) y (Figura 3I) transformadas de Fourier 2D de las regiones marcadas de (Figura 3B), (Figura 3E) y (Figura 3H), respectivamente.
- Figuras 4A - 4F.** Diámetros hidrodinámicos medios de (Figura 4A) L-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 4B) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 4C) S-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 4D) L-CWO revestidas con PEG-PLA, (Figura 4E) M-CWO revestidas con PEG-PLA y (Figura 4F) S-CWO revestidas con PEG-PLA en agua Milli-Q (rojo) y NaCl 150 mM (azul). Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,025 mg/ml.
- 20 **Figuras 5A - 5F.** Espectros de emisión de fluorescencia de muestras de CWO (Figura 5A) sin revestir con BCP, (Figura 5B) revestidas con PEG-PnBA y (Figura 5C) revestidas con PEG-PLA con una excitación de 200 nm. Intensidades de fluorescencia de muestras de CWO (Figura 5D) sin revestir con BCP, (e) revestidas con PEG-PnBA y (Figura 5F) revestidas con PEG-PLA medidas a una longitud de onda de emisión fija de 420 nm en función de la longitud de onda de excitación. Se muestran también los ajustes lineales de los datos usados para calcular las energías del salto de banda de fluorescencia (es decir, las intersecciones de x). Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml.
- 25 **Figuras 6A - 6F.** Espectros de emisión de fosforescencia de muestras de CWO (Figura 6A) sin revestir con BCP, (Figura 6B) revestidas con PEG-PnBA y (Figura 6C) revestidas con PEG-PLA con una excitación de 200 nm (con un tiempo de desintegración de 4 ms, un tiempo de retraso de 0,2 ms, un tiempo de permanencia de 5 ms y un tiempo promedio de 100 ms). Intensidades de fosforescencia de muestras de CWO (Figura 6D) sin revestir con BCP, (Figura 6E) revestidas con PEG-PnBA y (Figura 6F) revestidas con PEG-PLA medidas a una longitud de onda de emisión fija de 420 nm en función de la longitud de onda de excitación. Se muestran también los ajustes lineales de los datos usados para calcular las energías del salto de banda de fluorescencia (es decir, las intersecciones de x). Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml.
- 30 **Figuras 7A-7H.** Intensidades OSL de (Figura 7A) de B-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 7B) L-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 7C) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 7D) S-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 7E) B-CWO revestidas con PEG-PLA, (Figura 7F) L-CWO revestidas con PEG-PLA, (Figura 7G) M-CWO revestidas con PEG-PLA y (Figura 7H) S-CWO revestidas con PEG-PLA medidos a una longitud de onda de emisión fija de 550 nm con una excitación de 700 nm en función del tiempo tras una irradiación de rayos X de 6 MV (a una dosis total de 20 Gy y una tasa de dosis de 0,4 Gy/min). Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 1,0 mg/ml en agua Milli-Q.
- 35 **Figuras 8A y 8B.** Fotografías de NP M-CWO revestidas con PEG-PLA (1,0 mg/ml en agua Milli-Q) (Figura 8A) 200 nm con irradiación UV y (Figura 8B) y rayos X 6 MV.
- Figuras 9A y 9B.** Espectros de RMN 1H de (Figura 9A) PEG113-PnBA46 y (Figura 9B) PEG113-PLA44 BCP.
- 40 **Figuras 10A y 10B.** Trazas de GPC para (Figura 10A) PEG113-PnBA46 (Mw/Mn = 1,45) y (Figura 10B) PEG113-PLA44 (Mw/Mn=1,17) BCP.
- Figuras 11A -11C.** Micrografías ópticas de (Figura 11A) B-CWO sin revestir, (Figura 11B) B-CWO revestido con PEG-PnBA y (Figura 11C) B-CWO revestidas con PEG-PLA en agua Milli-Q (todas a una concentración idéntica de CWO de 1,0 mg/ml). Las barras de escala representan 20 µm.
- 45 **Figuras 12A - 12B.** Espectros de (Figura 12A) fluorescencia y (Figura 12B) fosforescencia de citrato (en agua Milli-Q), CTAB (en agua Milli-Q), oleilamina (en cloroformo), ácido oleico (en cloroformo), PEG-PnBA (en agua Milli-Q), PEG-PnBA (en cloroformo), PEG-PLA (en agua Milli-Q) y PEG-PLA (en cloroformo) medidos con una excitación de 200 nm.
- Figuras 13A - 13C.** (Figura 13A) espectros de absorción UV de B-CWO sin revestir (disperso en agua Milli-Q), L-CWO revestidas con citrato (en agua Milli-Q), M-CWO revestidas con CTAB (en cloroformo), y S-CWO revestidas con oleilamina/ácido oleico (en cloroformo). (Figura 13B) espectros de absorción UV de B-CWO revestidas PEG-PnBA, L-CWO revestidas con PEG-PnBA, M-CWO revestidas con PEG-PnBA y S-CWO revestidas con PEG-PnBA. (Figura 13C) espectros de absorción UV de B-CWO revestidas con PEG-PLA, L-CWO revestidas con
- 60

PEG-PLA, M-CWO revestidas con PEG-PLA, y S-CWO revestidas con PEG-PLA. todas las muestras de CWO revestidas con BCP se dispersaron en agua Milli-Q.

**Figuras 14A - 14F.** Espectros de absorción en el UV visible de (Figura 14A) PEG-PnBA en agua Milli-Q, (Figura 14B) PEG-PLA en agua Milli-Q, (Figura 14C) citrato en agua Milli-Q, (Figura 14D) CTAB en agua Milli-Q, (Figure 14AE) ácido oleico en cloroformo y (Figura 14F) oleilamina en cloroformo.

**Figuras 15A - 15H.** Espectros de emisión OSL de (Figura 15A) de B-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 15B) L-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 15C) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 15D) S-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 15E) B-CWO revestidas con PEG-PLA, (Figura 15F) L-CWO revestidas con PEG-PLA, (Figura 15G) M-CWO revestidas con PEG-PLA y (Figura 15H) S-CWO revestidas con PEG-PLA medidos en el modo fluorescencia con una excitación de 700 nm como funciones del tiempo tras una irradiación de rayos X de 6 MV (a una dosis total de 20 Gy y una tasa de dosis de 0,4 Gy/min). Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 1,0 mg/ml en agua Milli-Q.

**Figuras 16A - 16H.** Espectros de emisión OSL de (Figura 16A) de B-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 16C) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 16E) M-CWO revestidas con PEG-PnBA y (Figura 16G) S-CWO revestidas con PEG-PnBA medidos en modo fluorescencia con una excitación de 700 nm como funciones del tiempo tras una irradiación de rayos X de 6 MV (a una dosis total de 5 Gy y una tasa de dosis de 0,4 Gy/min). (Figura 16B), (Figura 16D), (Figura 16F) y (Figura 16H) son gráficos de las intensidades OSL estimadas a una longitud de emisión fija de 550 nm de (Figura 16A), (Figura 16AC), (Figura 16D) y (Figura 16G), respectivamente. Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml en agua Milli-Q.

**Figuras 17A - 17H.** Espectros de emisión OSL de (Figura 17A) de B-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 17C) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 17E) M-CWO revestidas con PEG-PnBA y (Figura 17G) S-CWO revestidas con PEG-PnBA medidos en modo fluorescencia con una excitación de 700 nm como funciones del tiempo tras una irradiación de rayos X de 6 MV (a una dosis total de 5 Gy y una tasa de dosis de 0,4 Gy/min). (Figura 17B), (Figura 17D), (Figura 17F) y (Figura 17H) son gráficos de las intensidades OSL estimadas a una longitud de emisión fija de 550 nm de (Figura 17A), (Figura 17C), (Figura 17D) y (Figura 17G), respectivamente. Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 1,0 mg/ml en agua Milli-Q.

**Figuras 18A - 18H.** Espectros de emisión OSL de (Figura 18A) de B-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 18C) M-CWO revestidas con PEG-PnBA, (Figura 18E) M-CWO revestidas con PEG-PnBA y (Figura 18G) S-CWO revestidas con PEG-PnBA medidos en modo fluorescencia con una excitación de 700 nm como funciones del tiempo tras una irradiación de rayos X de 6 MV (a una dosis total de 20 Gy y una tasa de dosis de 0,4 Gy/min). (Figura 18B), (Figura 18D), (Figura 18F) y (Figura 18H) son gráficos de las intensidades OSL estimadas a una longitud de emisión fija de 550 nm de (Figura 18A), (Figura 18C), (Figura 18D) y (Figura 18G), respectivamente. Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml en agua Milli-Q.

### Descripción detallada de la invención

Esta sección introduce aspectos que pueden ayudar a facilitar una mejor comprensión de la divulgación. Por consiguiente, estas declaraciones deben leerse de esta forma y no deben considerarse como admisiones acerca de lo que es o lo que no es técnica anterior.

En respuesta a la necesidad no satisfecha, en el presente documento se divulgan formulaciones en las que partículas de tungstato metálico están encapsuladas dentro de revestimientos poliméricos biocompatibles dirigidos a células enfermas. Dichas formulaciones convierten las partículas de tungstato metálico en adecuadas para la obtención de imágenes y aplicaciones terapéuticas *in vivo*.

Específicamente, tal como se describe adicionalmente a continuación, se presenta en el presente documento una formulación que comprende una partícula cristalina o agregado de partículas encapsulado dentro de un copolímero en bloque anfifílico biocompatible que comprende poli(etilenglicol-bloque-acrilato *den*-butilo) (PEG-PnBA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA), en donde dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio (CaWO<sub>4</sub>). Puede ser que la partícula sea un material compuesto que comprenda (i) CaWO<sub>4</sub> y (ii) otro compuesto inorgánico u orgánico biocompatible.

Puede ser que la dimensión media más grande de dicho material de partícula esté en el intervalo entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50.000 nm en su estado sin agregar. Puede ser que la dimensión media más grande de dicho agregado de partículas esté en el intervalo entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 500.000 nm. Puede ser que el diámetro medio de dicha partícula o agregado de partículas esté en el intervalo entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm.

Puede ser que la partícula o dicho material de revestimiento esté funcionalizado con un agente diana específico de células enfermas en seres humanos o animales. Puede ser que las células enfermas sean células cancerosas.

En otro aspecto más, se presenta una partícula radioluminiscente encapsulada en polímero, en donde dicha partícula es una partícula de tungstato de calcio (CaWO<sub>4</sub>). Específicamente, dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio (CaWO<sub>4</sub>) y el polímero es un copolímero en bloque anfifílico biocompatible que comprende

5 poli(etilenglicol-bloque-acrilato *den*-butilo) (PEG-PnBA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA). Puede ser que el diámetro medio de dicho material en forma de partículas esté en el intervalo entre aproximadamente 0,1 y 1.000 nm. Puede ser que el diámetro medio de dicha partícula esté comprendido entre aproximadamente 1 y 10  $\mu\text{m}$ . Puede ser que el diámetro medio de dicha de partícula está en el intervalo entre aproximadamente 1 y 200 nm. Puede ser que la partícula encapsulada en polímero esté funcionalizada o conjugada con un agente diana específico de un cáncer. Puede ser que el agente diana sea una molécula biológica que tenga afinidad específica por dicho cáncer con el fin de potenciar la administración de dichas partículas encapsuladas en polímero a células tumorales. Puede ser que la partícula esté funcionalizada con polietilenglicol (PEG), poli(ácido D,L-láctico-aleat-ácido glicólico) (PLGA), o una de sus combinaciones.

10 Los cristales de  $\text{CaWO}_4$  (CWO) se han estudiado por sus propiedades únicas de luminiscencia. CWO produce un espectro de emisión amplio con excitación a longitudes de onda  $< 250$  nm debido a la coordinación tetraédrica del  $\text{WO}_4$  y a la coordinación deltaédrica del  $\text{CaO}_8$ ; <sup>1</sup> las fotografías que se muestran en la Figura 8 demuestran la emisión de luz azul por las NP CWO con una excitación UV de 250 nm o con rayos X de 6 MV. Los cálculos de los orbitales moleculares sugieren que  $\text{WO}_4^{2-}$  en el estado tetraédrico  $\text{WO}_4$  tiene una banda de valencia compuesta de orbitales de oxígeno 2p ( $\text{O}(2p_x + 2p_y + 2p_z)$ ) y una banda de conducción compuesta de orbitales de tungsteno 5d ( $W(5d_{z^2} + 5d_{x^2-y^2})$ ) y  $W(5d_{xy} + 5d_{yz} + 5d_{xz})$ ) (Figura 1). Una transición electrónica desde los orbitales moleculares  $W(5d_{xy} + 5d_{yz} + 5d_{xz})$  a O 2p del  $\text{WO}_4$  produce una emisión de luz azul a una longitud de onda de 420 nm. Una emisión verde a 480 - 490 nm se ha atribuido a los centros de defectos por vacantes de oxígeno en  $\text{WO}_3$  o a la transición electrónica desde los orbitales moleculares  $W(5d_{z^2} + 5d_{x^2-y^2})$  a O 2p del ion complejo  $\text{WO}_4^{2-}$ . Se ha observado también una emisión roja desde el  $\text{CaWO}_4$  inactivado con una longitud de onda de excitación más larga y se ha adscrito a transiciones electrónicas en complejos de tungstato superiores. El estado singlete de CWO tiene una constante del tiempo de desintegración relativamente larga (8  $\mu\text{s}$ ), lo que convierte este material en adecuado para usar en sistemas integrados de detección de rayos X como material de centelleo. Se han estudiado las propiedades de luminiscencia estimuladas óptica y térmicamente de CWO irradiado respecto a aplicaciones potenciales en dosimetría. Los cristales de CWO masivos se usan actualmente en diversas aplicaciones incluyendo pantallas intensificadoras de rayos X, diodos emisores de luz, centelleadores y dosimetría. El CWO es químicamente estable, no libera iones  $\text{WO}_4^{2-}$  y es insoluble en solución acuosa. Su MSDS lo clasifica como una sustancia no peligrosa que no posee propiedades carcinogénicas y no requiere declaraciones de precaución. Los estudios que investigan materiales de empaste dental que poseen radioopacidad han ensayado el  $\text{CaWO}_4$  sin encapsular para determinar su biocompatibilidad y no se ha encontrado toxicidad asociada contra las líneas de células periodontales y osteogénicas. Además, se ha comprobado que el  $\text{CaWO}_4$  encapsulado no posee citotoxicidad detectable contra células HeLa.

35 En la actualidad, no se han publicado datos sobre la toxicidad de CWO en su forma nanoparticulada. Las NP CWO tienen poca estabilidad coloidal en solución acuosa. Los procedimientos de síntesis convencionales para preparar NP CWO implican el uso de materiales tensioactivos como citrato de sodio, bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), o poli(etilenglicol) (PEG) como agente de control y estabilización de la reacción. Sin embargo, las capacidades de estabilización de estos tensioactivos son muy limitadas. El citrato es un ligando aniónico. El CTAB forma un revestimiento catiónico. El PEG no se fisisorbe sobre CWO, y la funcionalización con PEG ("PEGilación") de las NP CWO requiere la modificación química del PEG. Un estudio notificó el uso de un tensioactivo no iónico TritonX-100 para la producción de las NP CWO en la fase de ciclohexano de un sistema de microemulsión.

45 La PEGilación de nanopartículas proporciona una barrera estérica para la adsorción de proteínas de opsonización, dando como resultado una toxicidad reducida y propiedades farmacocinéticas mejoradas. La conjugación química de las cadenas de PEG prefabricadas a la superficie de la nanopartícula es un método común para producir NP pegiladas. Sin embargo, este método no produce capas de PEG injertadas densas debido al impedimento estérico producido por las cadenas de PEG inicialmente injertadas. La PEGilación incompleta de las NP da como resultado una baja estabilidad coloidal. Como alternativa, se pueden usar copolímeros en bloque anfífilicos basados en PEG (BCP) para encapsular las estructuras micelares del polímero revestido con PEG en las NP mediante un proceso de intercambio de disolventes. Se ha demostrado que este método produce unidades NP/BCP muy estables que mantienen su estabilidad e integridad tras la exposición a entornos fisiológicos.

50 Como se ha señalado anteriormente, la partícula encapsulada en polímero de la invención puede estar funcionalizada o conjugada con un agente diana específico de un cáncer. Puede ser que dicho agente diana sea una molécula biológica que tenga afinidad específica por dicho cáncer con el fin de potenciar la administración de dichas partículas encapsuladas en polímero a células tumorales. El cáncer puede incluir cualquier cáncer. Puede ser que el cáncer sea un cáncer de pulmón. Puede ser que el cáncer sea carcinoma de pulmón microcítico (SCLC), y puede ser que el cáncer sea un carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).

60 Como se divulga además en el presente documento, Se pueden usar nanocristales de  $\text{CaWO}_4$  (CWO) en obtención de imágenes y terapias biomédicas debido a las formas únicas en las que este material interactúa con radiación de alta energía (Figura 1). Estas aplicaciones, sin embargo, requieren el desarrollo de formulaciones de nanopartículas (NP) que sean adecuadas para aplicaciones *in vivo*; principalmente, las nanopartículas formuladas deben ser suficientemente pequeñas, química y biológicamente inertes, y estables frente a la agregación en condiciones

5 fisiológicas. La presente divulgación demuestra al menos uno de dichos métodos y formulación, en los que nanopartículas de CWO se encapsulan en micelas de copolímeros en bloque bioinertes (BCP). A fines demostrativos, los inventores prepararon tres muestras de nanocristales de CWO diferentes que tienen diferentes tamaños (3, 10 y 70 nm de diámetro) y formas (rómicas alargadas frente a rómicas truncadas). Dependiendo del método de síntesis específico utilizado, las NP CWO como fueron sintetizadas contienen diferentes materiales tensoactivos (ácido cítrico, bromuro de cetil trimetilamonio, o una mezcla de ácido oleico y oleilamina) en las capas de revestimiento. Independientemente del tipo de tensoactivo, el revestimiento de tensoactivo original puede sustituirse con un nuevo cerramiento formado por materiales BCP usando un método de intercambio de disolvente. Se han sometido a ensayo dos tipos de BCP: poli(etilenglicol-bloque-acrilato de n-butilo) (PEG-PnBA), y poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA). Ambos BCP pueden producir NP CWO completamente PEGiladas que son estables frente a la agregación en condiciones salinas fisiológicas durante periodos de tiempo indefinidos. Se caracterizaron ampliamente las propiedades ópticas y de radioluminiscencia de las NP CWO encapsuladas con BCP y revestidas de tensoactivos. El estudio confirma que la estructura de revestimiento con BCP no altera las propiedades de luminiscencia de las NP CWO.

15 Como se divulga en el presente documento, las NP CWO encapsuladas con BCP estables se pueden producir también usando una técnica de intercambio de disolventes. Se prepararon NP CWO de diferentes tamaños y formas mediante la reacción de tungstato de sodio dihidratado con sal de calcio usando diferentes combinaciones de disolvente y tensoactivo. Estas muestras de CWO presentaron diferentes grados de cristalinidad. Estas NP CWO se encapsularon en los BCP PEG-PnBA o PEG-PLA biocompatibles. Las NP encapsuladas con BCP eran estables frente a la agregación en condiciones salinas fisiológicas durante periodos de tiempo indefinidos. Se caracterizaron ampliamente las propiedades de luminiscencia de las NP CWO encapsuladas con pristina y BCP. Para una masa idéntica de material de CWO, las NP mostraron una luminiscencia mucho más intensa (fluorescencia/fosforescencia/OSL tras la irradiación con rayos X) que el polvo a granel ya que las NP tienen áreas superficiales más grandes. Se midió que las NP CWO tenían energías de salto de banda de fluorescencia mayores que el CWO a granel. La estructura de revestimiento de BCP no altera las propiedades de luminiscencia de las NP CWO. Las NP CWO encapsuladas con BCP son materiales prometedores en aplicaciones biomédicas debido a su estabilidad coloidal, la biocompatibilidad y propiedades ópticas y de radioluminiscencia únicas. El presente estudio proporciona una fuerte base para estudios adicionales de las NP CWO encapsuladas con BCP para aplicaciones específicas.

30 A fines demostrativos en esta divulgación, se usaron cuatro muestras diferentes de CWO: una muestra de polvo de CWO a granel comercialmente disponible (de 2 - 3  $\mu\text{m}$  de diámetro; denominada a partir de ahora en el presente documento "B-CWO"), y tres muestras de NP CWO monodispersas que tienen tamaños diferentes (70, 10 y 3 nm de diámetro) sintetizadas en el laboratorio de los investigadores (denominadas a partir de ahora en el presente documento "L-CWO", "M-CWO", y "S-CWO", respectivamente). El material de B-CWO como fue adquirido no tiene revestimiento sobre la superficie. Las muestras de NP CWO se sintetizaron usando tres tensoactivos diferentes: ácido cítrico (L-CWO), CTAB (M-CWO), y una mezcla de ácido oleico y oleilamina (S-CWO). Las formas fueron también diferentes entre las diferentes muestras de NP: rómicas alargadas (L-CWO), rómicas truncadas/redondeadas (M-CWO) e irregulares (S-CWO). Independientemente del tipo de tensoactivo, el revestimiento de tensoactivo original podría sustituirse satisfactoriamente con materiales BCP utilizando el método de intercambio de disolventes desarrollado en el laboratorio de los inventores. Se han sometido a ensayo dos tipos de BCP: poli(etilenglicol-bloque-acrilato de n-butilo) (PEG-PnBA), y poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA). Se ha descubierto que ambos polímeros podrían producir productos de NP CWO completamente PEGilados que están esencialmente desprovistos de tensoactivos y son estables frente a la agregación a concentraciones salinas fisiológicas durante periodos de tiempo indefinidos. Independientemente del tamaño del material de nanocristales de CWO puros utilizado, se determinó que los diámetros hidrodinámicos medios de las NP CWO encapsuladas con PEG-PLA BCP resultantes eran siempre mayores que los correspondientes a las NP CWO encapsuladas con PEG-PnBA; en las unidades CWO/PEG-PnBA se encapsularon CWO-NP individuales en cada micela de BCP, mientras que, en las unidades CWO/PEG-PLA, las NP se encapsularon como grupos dentro de los dominios del núcleo hidrófobo de las micelas de BCP. Se caracterizaron ampliamente las propiedades ópticas y de radioluminiscencia de las NP CWO encapsuladas con BCP y revestidas de tensoactivos. La encapsulación del polímero no altera la actividad de luminiscencia de CWO. Tampoco el tipo de polímero, es decir, tanto si de las NP CWO se encapsularon como las NP individuales o grupos.

B-CWO se adquirió de Sigma-Aldrich y se usó tal como fue recibida. Las muestras de L-CWO, M-CWO y S-CWO NP se sintetizaron usando diferentes procedimientos. Las NP L-CWO se sintetizaron mediante un método hidrotérmico. En primer lugar, 0,006 mol de ácido cítrico ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich) se disolvieron en 20 ml de agua Milli-Q purificada. A continuación, se añadieron 0,003 mol de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (99 %, Acros Organics) y 0,006 mol de  $\text{CaCl}_2$  (99 %, Mallinckrodt Chemicals) a la solución. Después, se añadió una cantidad adecuada de NaOH (98,7 %, Macron Chemicals) a la solución para ajustar el pH a aproximadamente 9. A  $\text{pH} < 4$ , no forma partículas. Después de que la solución se transfiriera a continuación a un autoclave de acero inoxidable revestido con Teflon, la temperatura se aumentó a 160  $^\circ\text{C}$  y la reacción se llevó a cabo durante 24 horas. Después de 24 horas de incubación, el autoclave se enfrió gradualmente a temperatura ambiente. El producto se lavó y centrifugó con agua Milli-Q tres veces.

Las L-CWO NP se sintetizaron mediante un método de microemulsión. En primer lugar, 20 ml de ciclohexano se mezclaron con 2 ml de hexanol. Se añadió CTAB (2 mmol) ( $\geq 99\%$ , Sigma) a esta mezcla disolvente, y a continuación, la solución se calentó a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  o hasta que la solución se volvió transparente (Solución 1). Por otra parte, 0,4 mmol de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (99 %, Acros Organics) se disolvieron en 0,6 ml de agua Milli-Q (Solución 2). A continuación, 0,4 mmol de  $\text{CaCl}_2$  se disolvieron en una mezcla de 0,564 ml de agua Milli-Q y 0,036 ml de solución de HCl 0,1 M (Solución 3). Las Soluciones 2 y 3 se inyectaron inmediatamente a la Solución 1, y la mezcla resultante se agitó intensamente. Tras aproximadamente un minuto, la mezcla se transfirió a un autoclave de acero inoxidable revestido con Teflon, y se calentó el autoclave a  $160\text{ }^\circ\text{C}$  y se mantuvo a esta temperatura durante 24 horas. Posteriormente, el autoclave se enfrió gradualmente a temperatura ambiente. El producto se recogió mediante centrifugación y se lavó dos veces con etanol para eliminar el ciclohexano residual y el CTAB en exceso.

Las S-CWO NP se sintetizaron mediante un método solvotérmico. 0,001 mmol de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  y 0,001 mmol de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (99 %, Sigma-Aldrich) se disolvieron en 30 ml de etilenglicol que contenía oleilamina (0,005 mmol) (70 %, Aldrich) y ácido oleico (0,005 mmol) ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) en un matraz de fondo redondo de 50 ml. La mezcla se calentó rápidamente a  $160\text{ }^\circ\text{C}$  en un baño de aceite y se mantuvo a esta temperatura durante 12 horas. Durante la reacción, el reactor se purgó con nitrógeno. Posteriormente, se retiró el baño de aceite y el reactor se enfrió gradualmente a temperatura ambiente. El producto se purificó lavando y centrifugando con etanol en exceso.

El PEG-PnBA BCP se sintetizó mediante polimerización por transferencia de cadena con adición y fragmentación reversible (RAFT) de nBA usando monometoxi PEG (PEG-ME,  $M_n$  5.000 g/mol, PDI 1,07, Polysciences, Inc.) como el material de partida. Se preparó PEG funcionalizado en el extremo con ácido 4-ciano-4-(fenilcarbonotioilto)pentanoico (PEG-CPCP) (CPCP,  $\geq 97\%$ , Aldrich) haciendo reaccionar PEG-ME con CPCP bajo la influencia catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP,  $\geq 99\%$ , Aldrich) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 99 %, Sigma-Aldrich). Se disolvieron CPCP y DMAP en diclorometano (DCM,  $\geq 99,8\%$ , Sigma-Aldrich) por debajo de  $0\text{ }^\circ\text{C}$  en un matraz de fondo redondo (Solución A). Se disolvió DCC en DCM por debajo de  $0\text{ }^\circ\text{C}$  en un matraz diferente (Solución B). Se añadió la Solución B a la Solución A a una temperatura de  $0\text{ }^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se precintó bajo atmósfera de nitrógeno y se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas. Posteriormente, el producto de reacción se filtró y precipitó en éter en exceso para purificar. Este proceso se repitió dos veces adicionales para eliminar CPCP. El precipitado resultante se secó al vacío y se almacenó a baja temperatura.

Para la polimerización de RAFT, un monómero de nBA de calidad comercial se pasó a través de una columna de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{MgSO}_4$  para eliminar los inhibidores de radicales libres. PEG-CPCP se disolvió en THF. Se añadió una cantidad adecuada del nBA purificado a esta solución de PEG-CPCP. La reacción de polimerización se inició añadiendo el iniciador 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) (ACVA) a la solución anterior a temperatura ambiente. La relación molar de ACVA a PEG-CPCP era de 0,1:1. La mezcla de reacción se precintó en un matraz de fondo redondo en atmósfera de nitrógeno y se colocó en un baño de aceite a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . La reacción se dejó continuar con agitación durante 48 horas. Para eliminar el nBA sin reaccionar, el producto de la polimerización se filtró y precipitó en un exceso de éter. Este proceso se repitió dos veces más. El precipitado final se secó al vacío y se almacenó a baja temperatura.

El copolímero dibloque de PEG-PLA se sintetizó mediante a polimerización del láctido con apertura de anillo catalizada por 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-eno (DBU, 98 %, Aldrich) (LA, una mezcla racémica). 0,45 g de PEG-ME se disolvieron en DCM (22 ml) secado con tamices moleculares. Después de un día, se añadió LA (0,35 g) a la solución de PEG-ME. Se inició la polimerización añadiendo 2 ml de una solución de DBU (3,35 mmol de DBU disueltos en 30 ml de DCM) a la mezcla de LA/PEG-ME a temperatura ambiente. La reacción de polimerización se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se terminó añadiendo 10 mg de ácido benzoico ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich). Se añadió la mezcla de polimerización gota a gota a 1000 ml de éter de petróleo para la precipitación. Después que el producto de PEG-PLA sedimentara en la parte inferior, se decantó el sobrenadante. El polímero se secó en un horno de vacío.

Se prepararon muestras B-CWO y L-CWO encapsuladas con PEG-PnBA o PEG-PLA del siguiente modo. 100,0 mg de PEG-PnBA o PEG-PLA se disolvieron en 3,9 g de dimetilformamida (DMF,  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich). se dispersó 1,0 mg de B-CWO o L-CWO en 2,1 g de agua Milli-Q. Las dos soluciones se mezclaron rápidamente, se agitaron mecánicamente (15000 rpm), y se ultrasonificaron durante 30 minutos. A continuación se dializó la mezcla usando una bolsa de diálisis (corte de pesos moleculares de 50 kDa) durante 3 días frente a un total de 1,0 litro de agua Milli-Q (sustituida con agua Milli Q tres veces) para eliminar la DMF.

Se prepararon muestras de M-CWO y S-CWO encapsuladas con PEG-PnBA o PEG-PLA de forma algo diferente a la anterior. Se dispersó 1,0 mg de M-CWO o S-CWO (purificado mediante centrifugación) en 1,0 g de DMF. Se añadieron 100,0 mg de PEG-PnBA o PEG-PLA en 2,9 g de la suspensión de nanopartículas anterior. Se agitó la mezcla usando un agitador mecánico vertical de alta velocidad (a 15000 rpm) con sonicación simultánea. Se añadieron 2,1 ml de agua Milli-Q a la solución de DMF. La mezcla resultante se emulsionó con un agitador mecánico y a continuación se ultrasonificó en un baño de sonicación durante 30 minutos. Esta emulsión se introdujo en una bolsa de diálisis (corte de pesos moleculares de 50 kDa) y se dializó durante 3 días frente a un total de 1,0 litro de

agua Milli-Q (sustituida regularmente con agua Milli Q) para eliminar el DMF.

Se caracterizaron propiedades estructurales detalladas (estructura y separación de la red cristalina, tamaño y forma del grano, y cristalinidad) de los nanocristales de CWO usando difracción de rayos X (XRD) (SmartLab, Rigaku) y las técnicas TEM de alta resolución (Tecnai 20, FEI). La Figura 2 muestra que los patrones de XRD de todas las muestras de CWO concuerdan con un patrón de XRD simulado (PDF n.º 07-0210), lo que confirma que las síntesis de NP fueron correctas. Se estimó que los valores de la anchura completa en el semimáximo (FWHM) para los picos a  $2\theta = 28,775^\circ$  eran  $0,21^\circ$  (B-CWO),  $0,76^\circ$  (L-CWO),  $0,49^\circ$  (M-CWO), y  $1,26^\circ$  (S-CWO).

La imagen TEM representativa que se muestra en la Figura 3A demuestra que las NP L-CWO tienen una forma rómbica, y que su longitud diagonal es aproximadamente de  $70 \pm 25$  nm. Como se muestra en las Figuras 3D y 3G, se observó que las NP M-CWO y S-CWO, por otro lado, estaban próximas a tener forma de cubo y esfera, respectivamente; se estimó que sus diámetros eran aproximadamente  $10 \pm 2$  y  $3 \pm 1$  nm, respectivamente. Es interesante señalar que esta tendencia en el tamaño de la NP no concuerda con lo que se esperaba de los datos de XRD FWHM basados en la ecuación de Scherrer. Los inventores señalan también que incluso aunque todas las reacciones de síntesis de NP se llevaron a cabo a una temperatura idéntica ( $160^\circ\text{C}$ ) durante un periodo de tiempo idéntico (12 horas), se ha descubierto que las propiedades cristalinas variaban entre las tres muestras de NP diferentes dependiendo del tensioactivo o del tipo de disolvente utilizado. Se analizaron además imágenes de gran aumento de las muestras (Figuras 3B, 3E y 3H) mediante la transformada de Fourier rápida (FFT). Los puntos de las FFT se asignaron a planos de reflexión específicos del cristal de CWO (Figuras 3C, 3F y 3I). Como se muestra en las figuras, los ángulos medidos entre dos planos de reflexión identificados concuerdan bien con las previsiones, confirmando la estructura cristalina de CWO de las NP.

Las muestras de CWO se encapsularon con PEG-PnBA o PEG-PLA usando un método de intercambio de disolventes. Se determinó que los grados de polimerización promedio en número de los bloques de PnBA y PLA de estos BCP con PEG-PnBA y PEG-PLA eran 46 y 44 mediante espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  (ARX300, Bruker), (Figuras 9A y 9B); Por tanto, en estas figuras, estos polímeros se denotan también como PEG113-PnBA46 y PEG113-PLA44. Se determinó mediante GPC (Waters Breeze HPLC System) que los índices de polidispersidad de estos polímeros eran 1,45 (PEG-PnBA) y 1,17 (PEG-PLA) (Figura 10).

Se midieron los diámetros hidrodinámicos de las NP L-CWO, M-CWO y S-CWO encapsuladas con PEG-PnBA en agua Milli-Q mediante DLS (ZetaPALS, Brookhaven Instruments) y se determinó que eran aproximadamente 70, 60 y 40 nm, respectivamente (Figuras 4a, 4b y 4c). Los diámetros hidrodinámicos de las NP L-CWO, M-CWO y S-CWO encapsuladas con PEG-PLA eran 190, 175 y 165 nm, respectivamente (Figuras 4D, 4E y 4F). Se confirmó que estas NP CWO encapsuladas con BCP eran estables frente a la agregación en condiciones salinas fisiológicas; sus tamaños hidrodinámicos no cambian tras la adición de NaCl 150 mM durante, al menos, un periodo de 30 días de forma similar a la observada con las nanovarillas de Au.<sup>30</sup> Se prepararon también muestras de B-CWO encapsuladas con PEG-PnBA y PEG-PLA y se usaron para medir el tamaño de las partículas de B-CWO mediante microscopía óptica; El revestimiento de BCP retrasa la agregación de B-CWO en agua y permite por tanto la obtención de imágenes de partículas de B-CWO individuales mediante microscopía. A partir de las imágenes que se muestran en la Figura 11, se estimó que los tamaños de las partículas de B-CWO estaban en el intervalo de aproximadamente 2 - 3  $\mu\text{m}$ .

Se registraron los espectros de las muestras de B-CWO, L-CWO, M-CWO y S-CWO en sus formas no revestidas con BCP para una excitación de 200 nm (Cary Eclipse, Varian) (Figuras 5A - 5F); esta longitud de onda es más corta que la correspondiente con la energía de salto de banda notificada para CWO a granel ( $5,27\text{ eV} = 235\text{ nm}$ )<sup>1</sup> y más larga que la correspondiente a la función de trabajo de CWO ( $12\text{ eV} = 103\text{ nm}$ )<sup>1</sup>, 5. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml. Las muestras de B-CWO y L-CWO se dispersaron en agua. Las muestras de M-CWO y S-CWO se dispersaron en cloroformo. Como se muestra en las Figuras 12A - 12B, los componentes orgánicos de las muestras (es decir, los BCP, tensioactivos residuales y disolventes) no producen ninguna señal de luminiscencia significativa. Para comparación, se midieron también los espectros de luminiscencia de las muestras de CWO encapsuladas con PEG-PnBA o PEG-PLA (a una concentración de CWO de 0,1 mg/ml en agua Milli-Q) con una excitación de 200 nm. Se midieron las intensidades de emisión en la región de 350 - 600 nm en el modo de fluorescencia en condiciones de tiempo de retraso-tiempo de desintegración cero. Como se puede observar en la Figura 5A, para una cantidad total dada de material de CWO, las partículas más pequeñas, en general, producen emisiones mayores debido a que tienen áreas superficiales más grandes. Sin embargo, entre las cuatro muestras ensayadas, M-CWO (en vez de S-CWO que tiene el tamaño más pequeño) mostró la fluorescencia más alta debido a la cristalinidad relativamente baja de la muestra de S-CWO (Figura 2). A pesar de las diferencias en la intensidad, se ha descubierto que las formas de los espectros eran idénticas entre todas las muestras ensayadas. También, como se muestra en las Figuras 5B y 5C, las estructuras de revestimiento de PEG-PnBA y PEG-PLA no alteran las características principales de los espectros de fluorescencia ni las tendencias de intensidad entre las diferentes muestras de CWO.

Se evaluaron las energías del salto de banda de fluorescencia de las diferentes muestras de CWO midiendo sus intensidades de emisión a la longitud de onda de emisión del pico de 420 nm para longitudes de onda de excitación

comprendidas en el intervalo de 200 - 280 nm, como se demuestra en la bibliografía 1, 44 (Figuras 5D, 5E y 5F). Cabe destacar que, no se podría usar la medición de la absorbancia UV para la determinación de la energía de salto de banda ya que, como se muestra en las Figuras 13A - 13C y en las Figuras 14A - 14F, BCP y los materiales tensoactivos usados en este estudio absorben fuertemente la luz UV. Sin embargo, ninguno de estos materiales produce una emisión significativa que pueda interferir con la fluorescencia de CWO a 420 nm (Figuras 12A - 12B). A partir de los datos que se muestran en la Figura 5A, por ejemplo, se estimó que las energías de salto de banda de los materiales de CWO sin revestir con BCP eran de 4,62 eV (B-CWO), 5,44 eV (L-CWO), 5,46 eV (M-CWO) y 5,46 eV (S-CWO). También, a partir de las Figuras 5E y 5F, se obtuvieron los siguientes valores de energía de salto de banda: 4,58 eV (B-CWO revestidas con PEG-PnBA), 5,45 eV (L-CWO revestidas con PEG-PnBA), 5,47 eV (M-CWO revestidas con PEG-PnBA), y 5,48 eV (S-CWO revestidas con PEG-PnBA); 4,58 eV (B-CWO revestidas con PEG-PLA), 5,44 eV (L-CWO revestidas con PEG-PLA), 5,46 eV (M-CWO revestidas con PEG-PLA), y 5,50 eV (S-CWO revestidas con PEG-PLA). Estos resultados indican claramente que el tamaño de nanoescala produce un ligero (pero significativo) desplazamiento hacia el azul de los espectros de emisión debido al efecto de confinamiento cuántico. Asimismo, pueden existir diferencias en los orbitales moleculares entre las formas masivas y las formas de nanopartículas de CWO; se ha notificado que la energía de salto de banda de CWO disminuye a 4,11 eV cuando se W se aleja de O en 0,3 Å. Las Figuras 4D, 4E y 4F demuestran también que las muestras de CWO no revestidas con BCP y revestidas con BCP proporcionan espectros de excitación similares, indicando que el proceso de encapsulación en BCP no altera la estructura electrónica del material de CWO.

Se midieron también los espectros de fosforescencia de las muestras de CWO con una excitación de 200 nm usando el modo fosforescencia con un tiempo de retraso de 0,2 ms y un tiempo de permanencia de 5 ms. Se llevaron a cabo todas las mediciones a una concentración de CWO idéntica de 0,1 mg/ml. Todos los espectros mostraron dos picos amplios en alrededor de 480 nm (debido a las transiciones de transferencia de carga dentro de los orbitales moleculares WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y 680 nm (debido probablemente a transiciones electrónicas en complejos de tungstato superiores)<sup>1, 5</sup> (Figuras 6A, 6B y 6C). Las tendencias con dependencia de la muestra en la intensidad de la fosforescencia fueron similares a las observadas en las mediciones de la fluorescencia; M-CWO muestra la fosforescencia más elevada, mientras que B-CWO muestra la más baja (Figuras 6A, 6B y 6C). PEG-PnBA y PEG-PLA no alteran los espectros de fosforescencia de CWO.

Se midieron las intensidades de emisión de fosforescencia a la longitud de onda de emisión de los picos de 480 nm en función de la longitud de onda de excitación desde 200 a 330 nm. Los resultados se presentan en las Figuras 6D, 6E y 6F; señalar que, en estas figuras, los datos se presentan en forma normalizada. A partir de los datos que se muestran en la Figura 6A, por ejemplo, se estimó que las energías de salto de banda de fosforescencia de los materiales de CWO sin revestir con BCP eran de 4,39 eV (B-CWO), 4,38 eV (L-CWO), 4,39 eV (M-CWO) y 4,38 eV (S-CWO). También, a partir de las Figuras 6e y 6f, se obtuvieron los siguientes valores de energía de salto de banda: 4,40 eV (B-CWO revestidas con PEG-PnBA), 4,41 eV (L-CWO revestidas con PEG-PnBA), 4,39 eV (M-CWO revestidas con PEG-PnBA), y 4,40 eV (S-CWO revestidas con PEG-PnBA); 4,40 eV (B-CWO revestidas con PEG-PLA), 4,43 eV (L-CWO revestidas con PEG-PLA), 4,40 eV (M-CWO revestidas con PEG-PLA), y 4,40 eV (S-CWO revestidas con PEG-PLA). Estos valores son significativamente diferentes de las energías de salto de banda de fluorescencia (4,62 - 5,46 eV); los procesos de fluorescencia y fosforescencia implican diferentes rutas electrónicas (Figura 1). En las muestras sin revestir con BCP y revestidas con BCP, se ha descubierto que el tamaño de nanoescala no alteraba las energías de salto de banda de fosforescencia (Figuras 6D, 6E y 6F), lo que no concuerda con lo observado en el análisis de los datos de la fluorescencia (Figuras 5D, 5E y 5F). De forma global, el revestimiento de BCP no altera significativamente las propiedades de fosforescencia de CWO.

Las propiedades de luminiscencia estimuladas ópticamente (OSL) de las NP CWO encapsuladas con BCP se caracterizaron tras la irradiación con rayos X 6 MV (Acelerador lineal EX de Varian). Se llevaron a cabo las mediciones a dos diferentes concentraciones de CWO: 1,0 y 0,1 mg/ml de CWO en agua Milli-Q. Se irradiaron las muestras a dos dosis diferentes de rayos X totales (20 y 5 Gy) con la misma tasa de dosis de 0,4 Gy/min. Se midieron los espectros de OSL de las muestras irradiadas con rayos X para una excitación de 700 nm en el modo fluorescencia bajo condiciones de tiempo de retraso/tiempo de desintegración cero (Cary Eclipse, Varian) (Figuras 15A - 15H). Se registraron las intensidades de emisión en el intervalo de longitudes de onda de 250 - 650 nm. Como se explica esquemáticamente en la Figura 1, los electrones atrapados en defectos dentro de las retículas cristalinas de CWO se vuelven a excitar con luz a 700 nm, y la liberación de estos electrones reexcitados en los estados de banda cercanos a la valencia puede producir por tanto emisiones a longitudes de onda más cortas que la longitud de onda de excitación de 700 nm. Los inventores sospechan que las vacantes de oxígeno en la estructura cristalina de CWO y/o los enlaces colgantes en la superficie del material sirven como sitios de atrapamiento de electrones, lo que parece estar respaldado por la observación de que B-CWO prácticamente no muestra propiedades OSL; véanse las Figuras 7A - 7H, Figuras 15A - 15H, Figuras 16A - 16H, Figuras 17A - 17H, y Figuras 18A - 18H. También como se muestra en estas figuras, las NP CWO presentaron claramente señales OSL, que desaparecieron normalmente en 2 - 3 horas.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la presente invención. No deben considerarse en forma alguna, sin embargo, como limitantes del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones.

Los expertos en la materia apreciarán que podrían realizarse cambios en las realizaciones descritas anteriormente. Se entiende, por lo tanto, que la presente invención no se limita a las realizaciones particulares divulgadas, sino que se pretende que cubra todas las modificaciones incluidas dentro del alcance de la invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas. Además, todas las referencias citadas en el presente documento son indicativas del nivel de experiencia en la técnica.

1. L. S. Cavalcante, V. M. Longo, J. C. Sczancoski, M. A. P. Almeida, A. A. Batista, J. A. Varela, M. O. Orlandi, E. Longo y M. S. Li, *CrystEngComm*, 2012, 14, 853-868.
2. E. Orhan, M. Anicete-Santos, M. A. M. A. Maurera, F. M. Pontes, A. G. Souza, J. Andres, A. Beltran, J. A. Varela, P. S. Pizani, C. A. Taft y E. Longo, *Journal of Solid State Chemistry*, 2005, 178, 1284-1291.
3. M. Nikl, *Measurement Science and Technology*, 2006, 17, R37-R54.
4. F. J. Manjón, D. Errandonea, J. López-Solano, P. Rodríguez-Hernández y A. Muñoz, *Journal of Applied Physics*, 2009, 105, 094321.
5. Z. Lou y M. Cocivera, *Materials Research Bulletin*, 2002, 1573-1582.
6. Y. Zhang, N. A. Holzwarth y R. T. Williams, *PHYSICAL REVIEW B*, 1998, 57, 12738-12750.
7. M. Moszynski, M. Balcerzyk, W. Czarnacki, A. Nassalski, T. Szczęśniak, H. Kraus, V. B. Mikhailik e I. M. Solskii, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2005, 553, 578-591.
8. S. Basu, B. Sanyasi Naidu, B. Viswanadh, V. Sudarsan, S. N. Jha, D. Bhattacharyya y R. K. Vatsa, *RSC Advances*, 2014, 4, 15606.
9. J. Zhao, W. Wu, J. Sun y S. Guo, *Chem Soc Rev*, 2013, 42, 5323-5351.
10. J. F. Endicott e Y.-J. Chen, *Coordination Chemistry Reviews*, 2007, 251, 328-350.
11. Y. G. Zdesenko, F. T. Avignone lli, V. B. Brudanin, F. A. Danevich, S. S. Nagorny, I. M. Solsky y V. I. Tretyak, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2005, 538, 657-667.
12. A. Shmlevich, D. Weiss, R. Chen y N. Kristianpoller, *Radiation Protection Dosimetry*, 1999, 84, 131-133.
13. R. Caruba, P. Iaconi, J. F. Cottrant y G. Calas, *Physics and Chemistry of Minerals*, 1983, 9, 223-228.
14. S. W. S. McKeever, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2001, 184, 29-54.
15. G. Blasse y B. C. Grabmaier, *Luminescent materials*, Springer-Verlag, Berlín; Nueva York, 1994.
16. A. L. G. Cornelio, L. P. Salles, M. C. da Paz, J. A. Cirelli, J. M. Guerreiro-Tanomaru y M. Tanomaru, *Journal of Endodontics*, 2011, 37, 203-210.
17. X. Zhai, M. Yu, Z. Cheng, Z. Hou, P. Ma, D. Yang, X. Kang, Y. Dai, D. Wang y J. Lin, *Dalton Trans*, 2011, 40, 12818-12825.
18. P. Y. Jia, X. M. Liu, G. Z. Li, M. Yu, J. Fang y J. Lin, *Nanotechnology*, 2006, 17, 734-742.
19. Y. Su, G. Li, Y. Xue y L. Li, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, 111, 6684-6689.
20. J. H. Ryu, J.-W. Yoon, C. S. Lim, W.-C. Oh y K. B. Shim, *Ceramics International*, 2005, 31, 883-888.
21. Y. Su, L. Li y G. Li, *Chemistry of Materials*, 2008, 20, 6060-6067.
22. M. Mai y C. Feldmann, *Journal of Materials Science*, 2011, 47, 1427-1435.
23. Y. Guo, G. Zhang, H. Gan e Y. Zhang, *Dalton Trans*, 2012, 41, 12697-12703.
24. S.-J. Chen, J. Li, X.-T. Chen, J.-M. Hong, Z. Xue y X.-Z. You, *Journal of Crystal Growth*, 2003, 253, 361-365.
25. K. A. Huynh y K. L. Chen, *Environ Sci Technol*, 2011, 45, 5564-5571.
26. T. B. Huff, M. N. Hansen, Y. Zhao, J.-X. Cheng y A. Wei, *Langmuir*, 2007, 23, 1596-1599.
27. S. Javadian, V. Ruhi, A. Heydari, A. Asadzadeh Shahir, A. Yousefi y J. Akbari, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52, 4517-4526.
28. J. Park, P. M. Fong, J. Lu, K. S. Russell, C. J. Booth, W. M. Saltzman y T. M. Fahmy, *Nanomedicine*, 2009, 5, 410-418.
29. D. E. Owens, 3º y N. A. Peppas, *Int J Pharm*, 2006, 307, 93-102.
30. D. H. Kim, A. Wei e Y. Y. Won, *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012, 4, 1872-1877.
31. J. Lee, J. Yang, H. Ko, S. Oh, J. Kang, J. Son, K. Lee, S. W. Lee, H. G. Yoon, J. S. Suh, Y. M. Huh y S. Haam, *Advanced Functional Materials*, 2008, 18, 258-264.
32. C. Grabinski, N. Schaeublin, A. Wijaya, H. D' Couto, S. H. Baxamusa, K. Hamad-Schifferli y S. M. Hussain, *ACS Nano*, 2011, 5, 2870-2879.
33. A. Kumar y G. M. Whitesides, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 1993, 206, 172-COLL.
34. G. H. Gao, J. W. Lee, M. K. Nguyen, G. H. Im, J. Yang, H. Heo, P. Jeon, T. G. Park, J. H. Lee y D. S. Lee, *J Control Release*, 2011, 155, 11-17.
35. D. H. Kim e Y.-Y. Won, *Macromolecular Reaction Engineering*, 2012, 6, 45-56.
36. Y. Lv, G. Ding, J. Zhai, Y. Guo, G. Nie y L. Xu, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 110, 411-418.
37. Y.-Y. Won, H. T. Davis y F. S. Bates, *Macromolecules*, 2003, 36, 953-955.
38. K. G. Sharma y N. R. Singh, *Journal of Rare Earths*, 2012, 30, 310-314.
39. S. Demirci, A. Celebioglu, Z. Aytac y T. Uyar, *Polym. Chem.*, 2014, 5, 2050-2056.
40. H. Lee, J. Lee, J. Park, T. Kwon, S. Hong e Y.-Y. Won, *Polymer Degradation and Stability*, 2015, 120, 149-157.
41. H. Borchert, E. V. Shevchenko, A. Robert, I. Mekis, A. Kornowski, G. G. bel y H. Weller, *Langmuir*, 2005, 21, 1931-1936.
42. A. L. Patterson, *Physical Review*, 1939, 56, 978-982.
43. A. Monshi, M. R. Foroughi y M. R. Monshi, *World Journal of Nano Science and Engineering*, 2012, 02, 154-

160.

44. H. Lin, C. Huang, W. Li, C. Ni, S. Shah e Y. Tseng, *Applied Catalysis B: Environmental*, 2006, 68, 1-11.

45. A. P. Alivisatos, *Science*, 1996, 271, 933-937.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación, que comprende una partícula cristalina o agregado de partículas encapsulado dentro de un copolímero en bloque anfílico biocompatible que comprende poli(etilenglicol-bloque-acrilato *den*-butilo) (PEG-Pn-BA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA), en donde dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio ( $\text{CaWO}_4$ ).
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde dicha partícula es una composición de material compuesto que comprende: (i) tungstato de calcio ( $\text{CaWO}_4$ ), y (ii) otros compuestos orgánicos o inorgánicos biocompatibles.
3. La formulación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la dimensión media más larga de dicha partícula está en el intervalo:
- 10 (a) entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50.000 nm, en su estado sin agregar; o  
(b) entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 500.000 nm; o  
(c) entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 500 nm.
- 15 4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha partícula o dicho material de revestimiento está funcionalizado con un agente de direccionamiento específico de células enfermas en seres humanos o animales.
5. La formulación de la reivindicación 4, en donde dichas células enfermas son células cancerosas.
- 20 6. Una partícula radioluminiscente encapsulada en polímero, en donde dicha partícula es una nanopartícula de tungstato de calcio ( $\text{CaWO}_4$ ) y en donde el polímero es un copolímero en bloque anfílico biocompatible que comprende poli(etilenglicol-bloque-acrilato de n-butilo) (PEG-PnBA) o poli(etilenglicol-bloque-ácido D,L-láctico) (PEG-PLA).
7. La partícula radioluminiscente encapsulada en polímero de la reivindicación 6, en donde el diámetro medio de dicha partícula está en el intervalo:
- 25 (a) entre aproximadamente 0,1 y 1000 nm; o  
(b) entre aproximadamente 1 y 10  $\mu\text{m}$ ; o  
(c) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 nm.
8. La partícula radioluminiscente encapsulada en polímero de una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde dicha partícula encapsulada en polímero está funcionalizada o conjugada con un agente de direccionamiento específico de un cáncer.
- 30 9. La partícula radioluminiscente encapsulada en polímero de la reivindicación 8, en donde dicho agente de direccionamiento es una molécula biológica que tiene afinidad específica por dicho cáncer con el fin de potenciar la administración de dichas partículas encapsuladas en polímero a células tumorales.

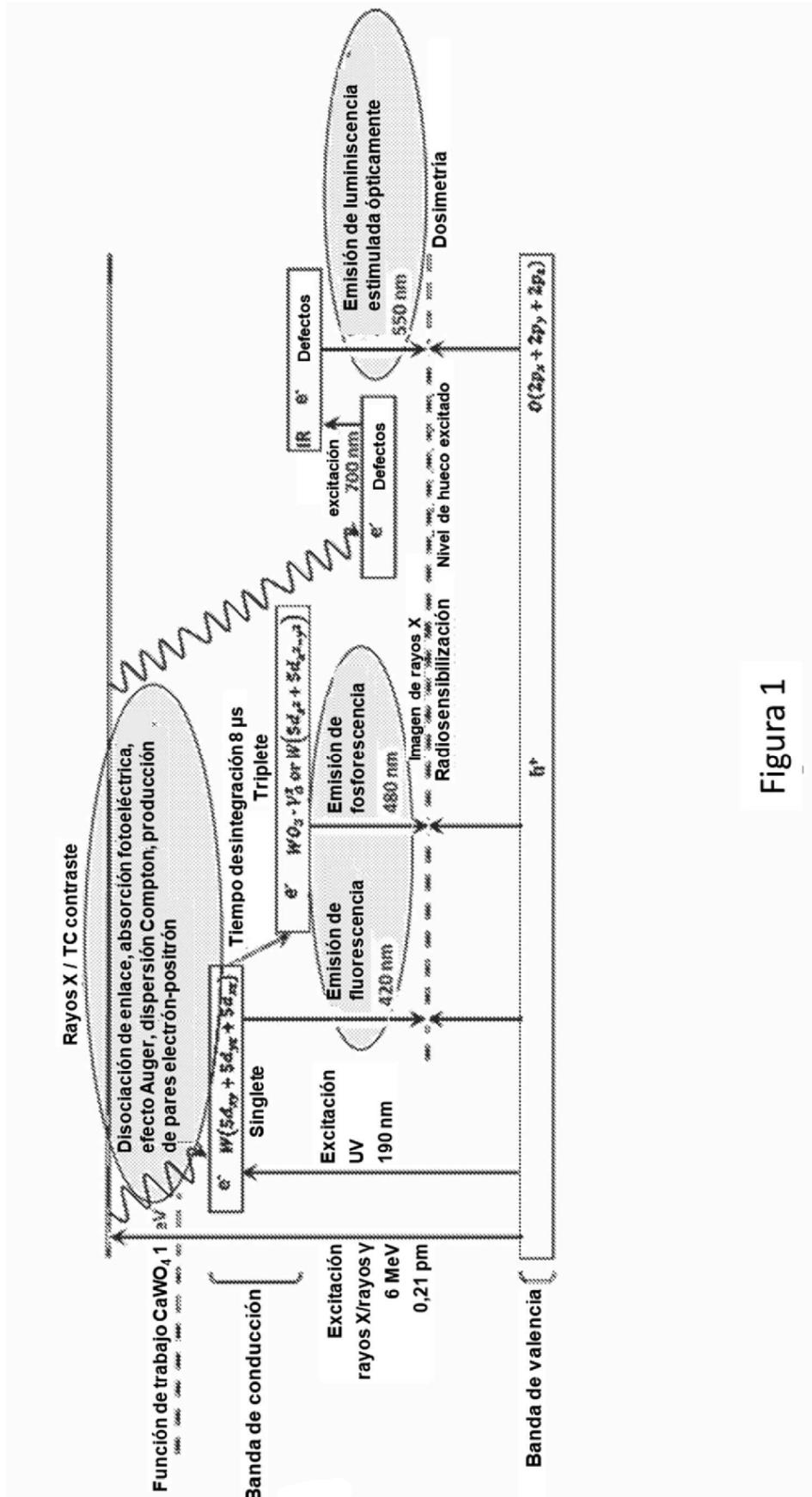


Figura 1

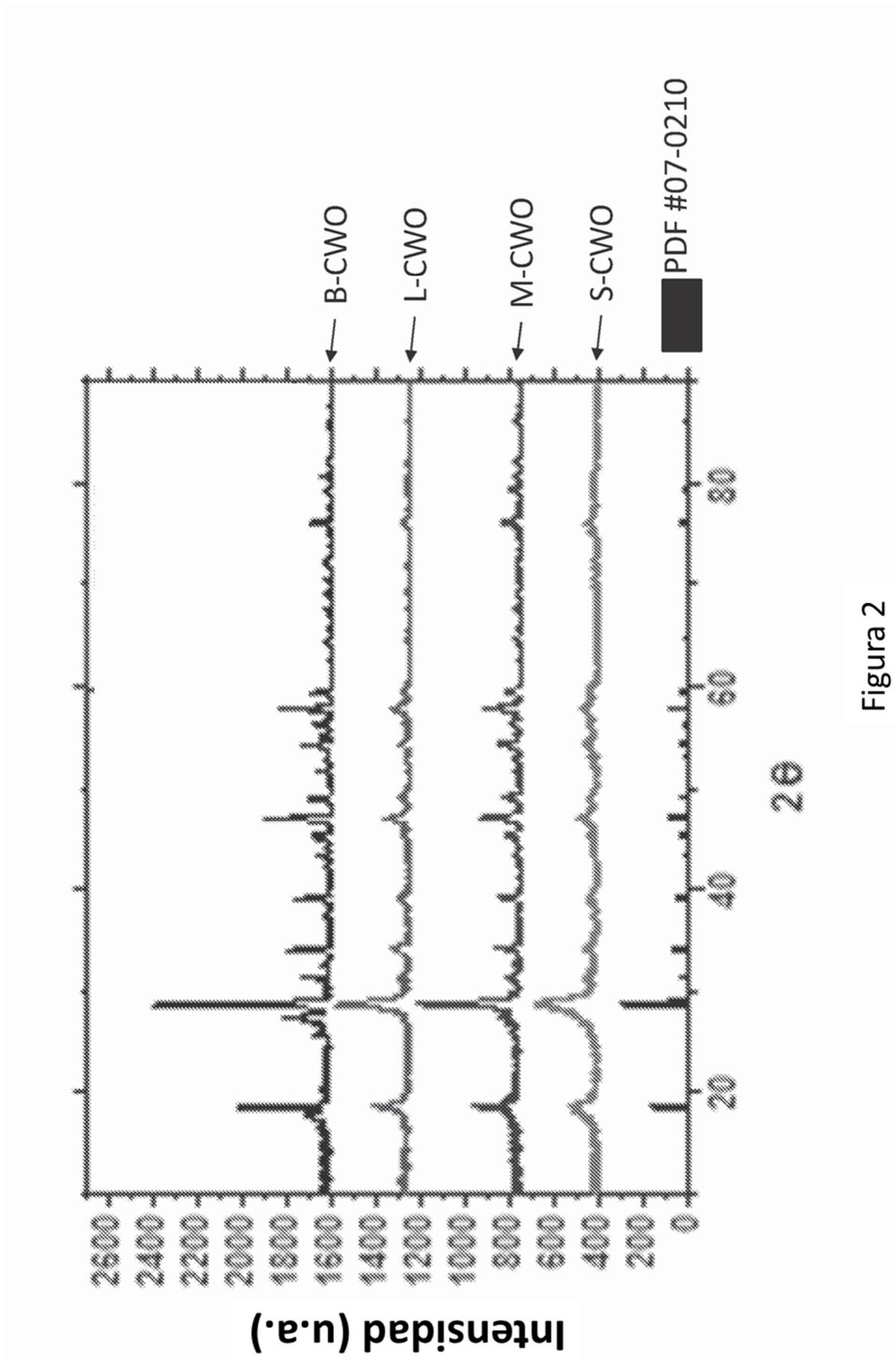


Figura 2

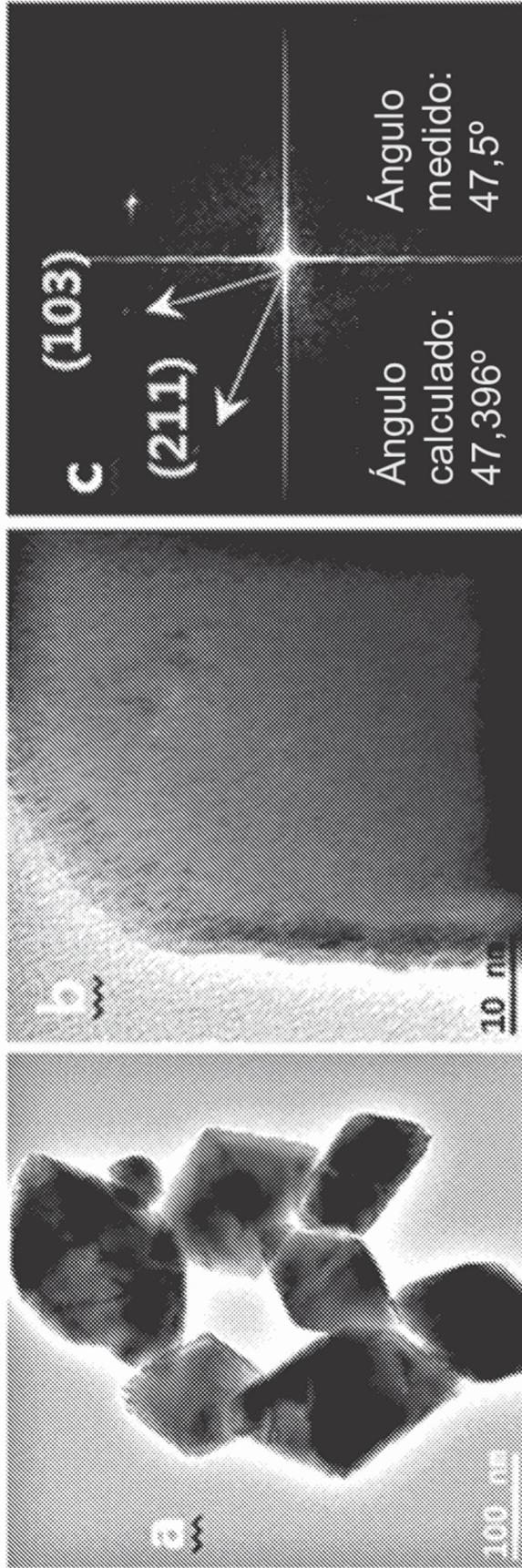


Figura 3A

Figura 3B

Figura 3C

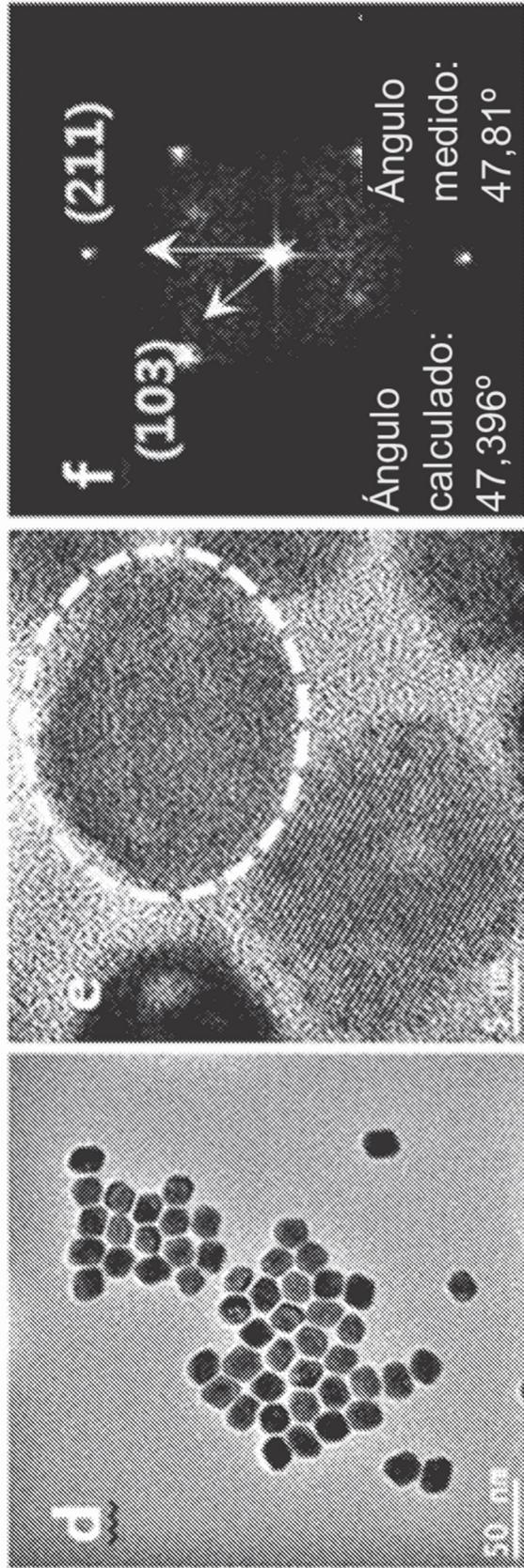


Figura 3D

Figura 3E

Figura 3F

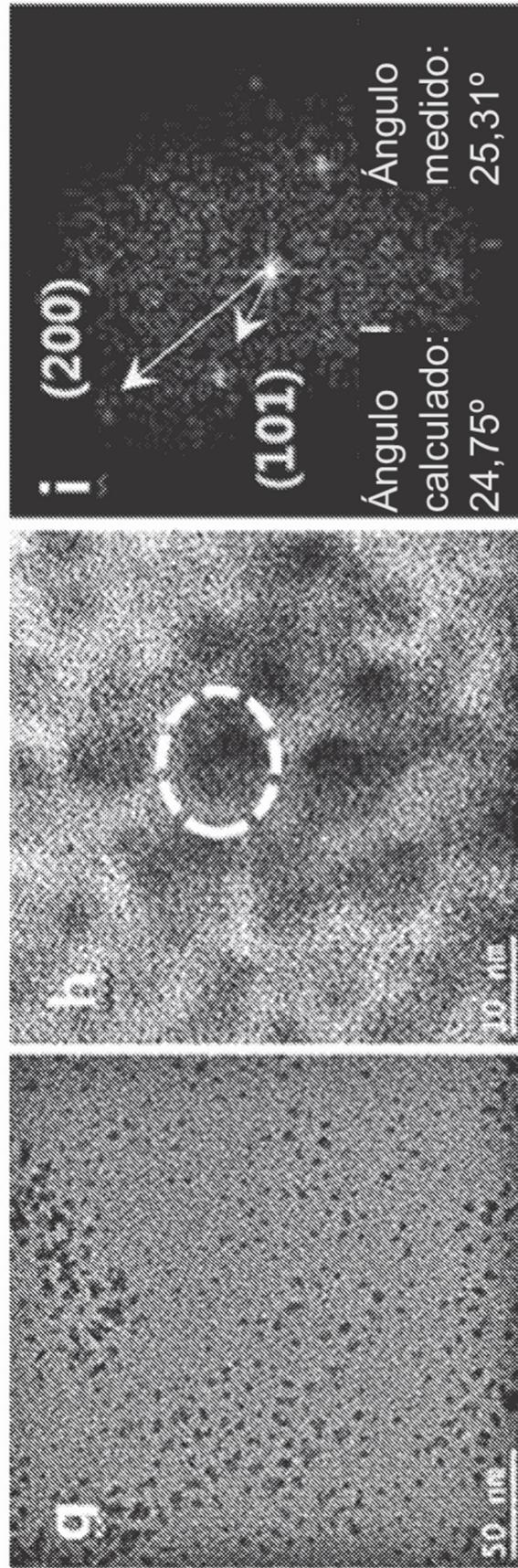


Figura 3G

Figura HE

Figura 3I

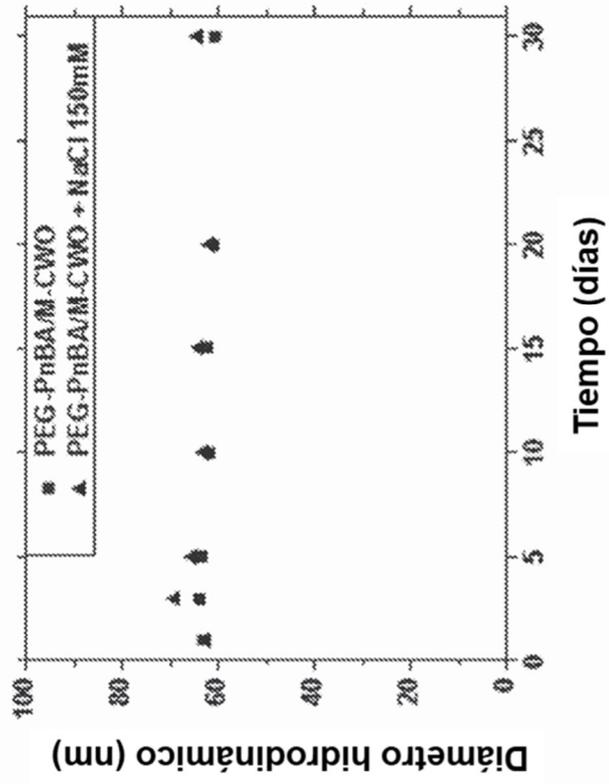


Figura 4B

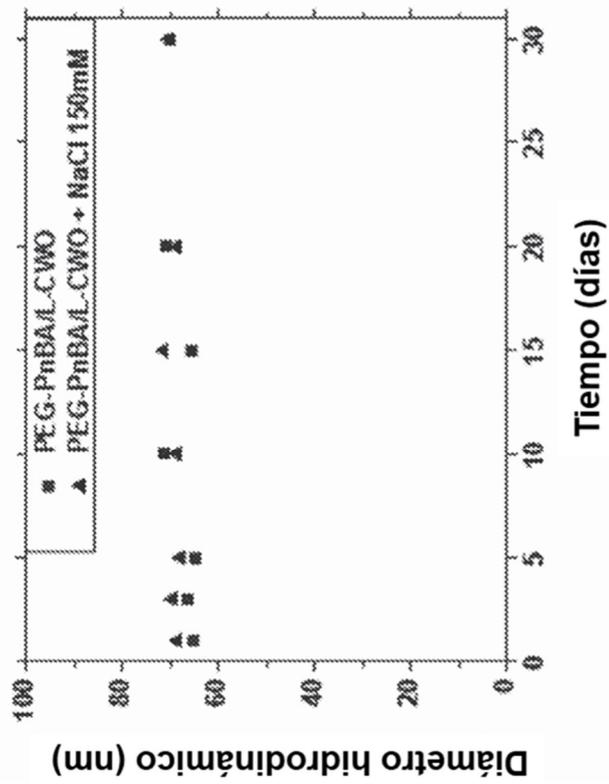


Figura 4A

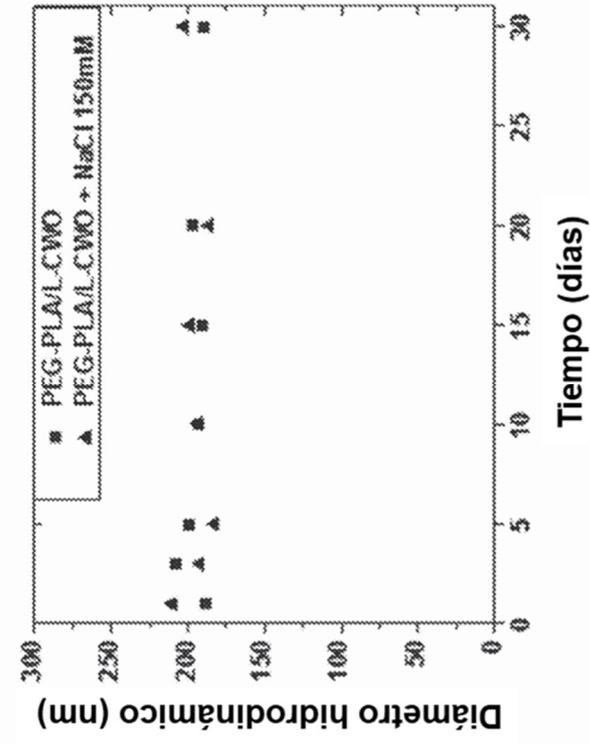


Figura 4D

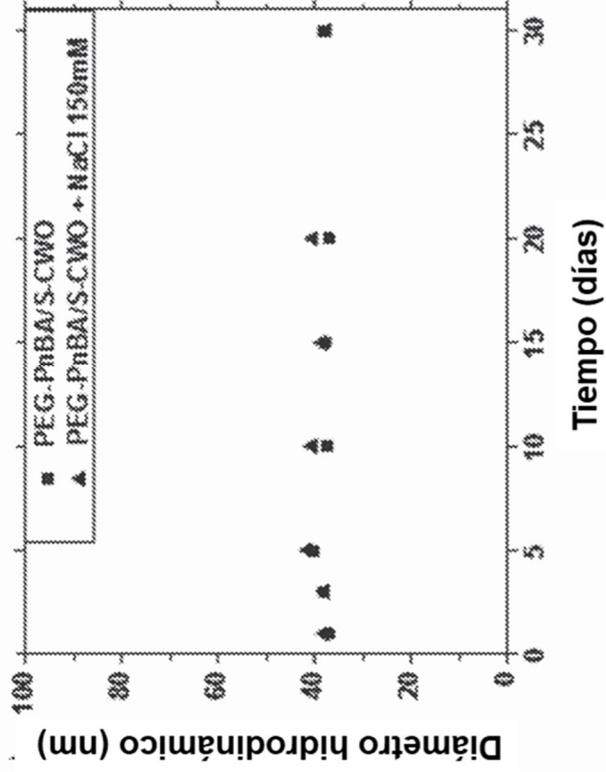


Figura 4C

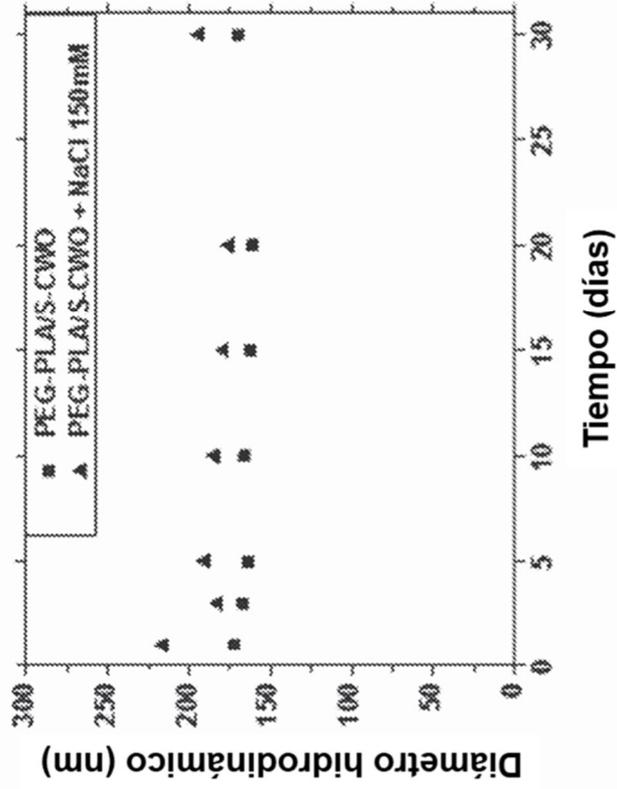


Figura 4F

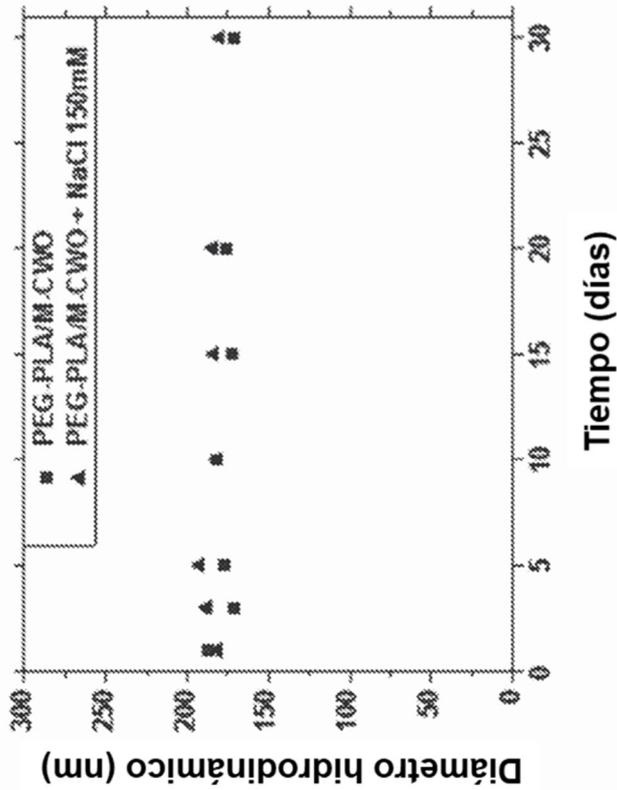


Figura 4E

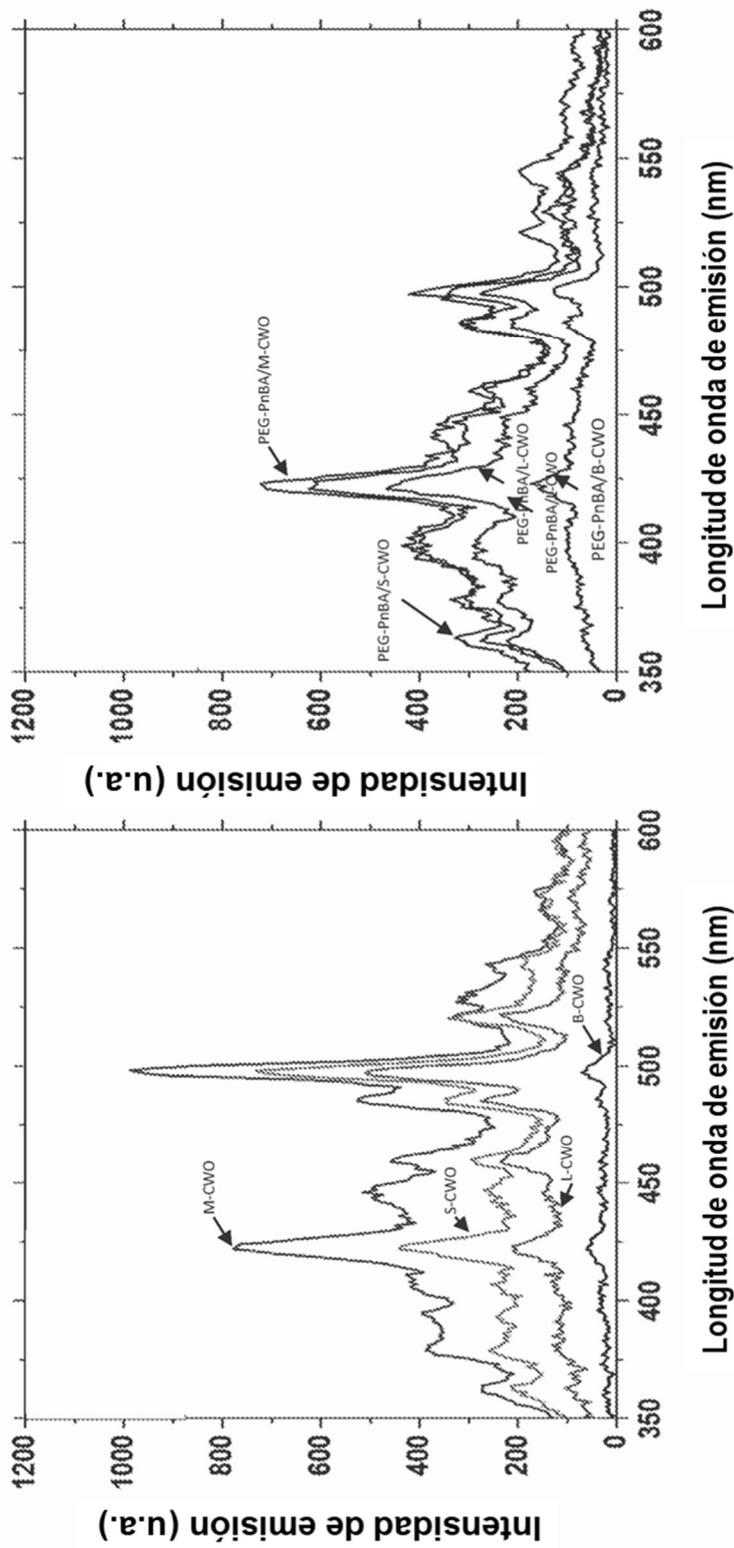


Figura 5B

Figura 5A

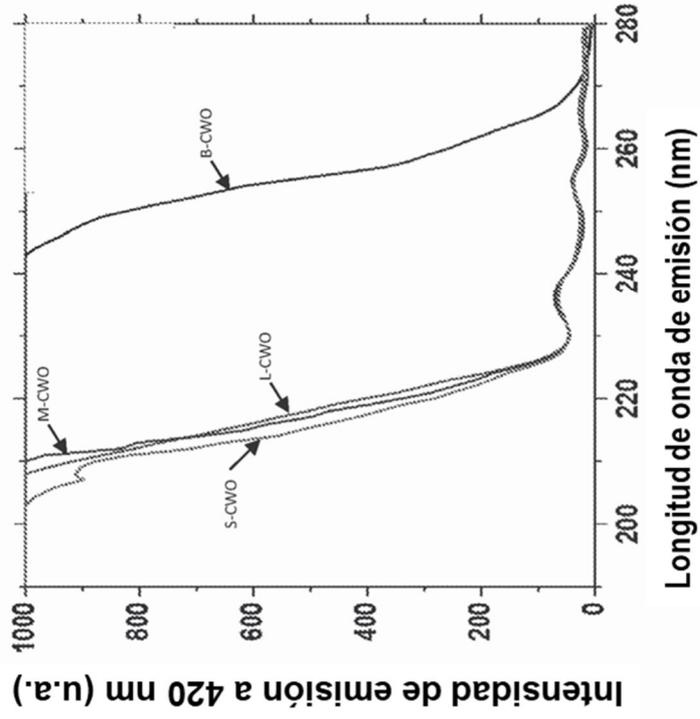


Figura 5Dc

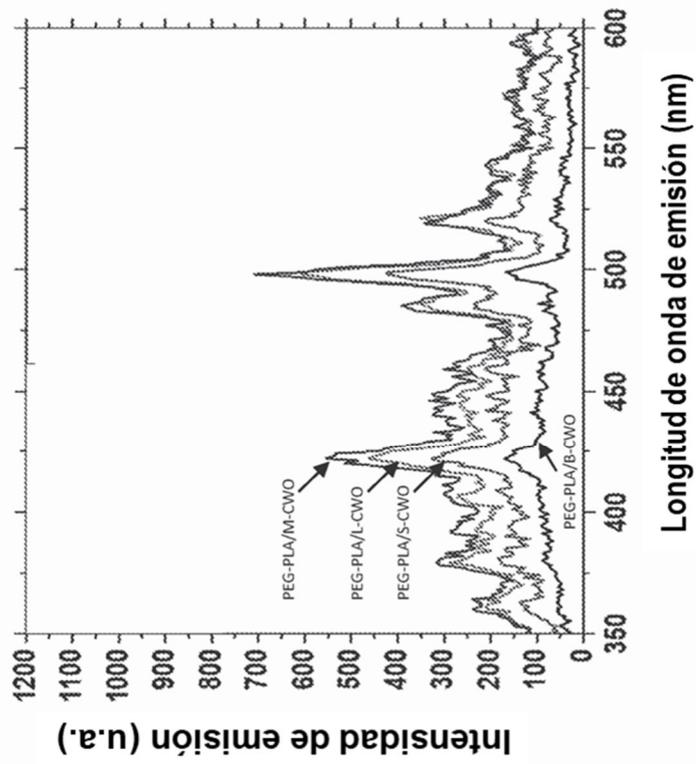


Figura 5C

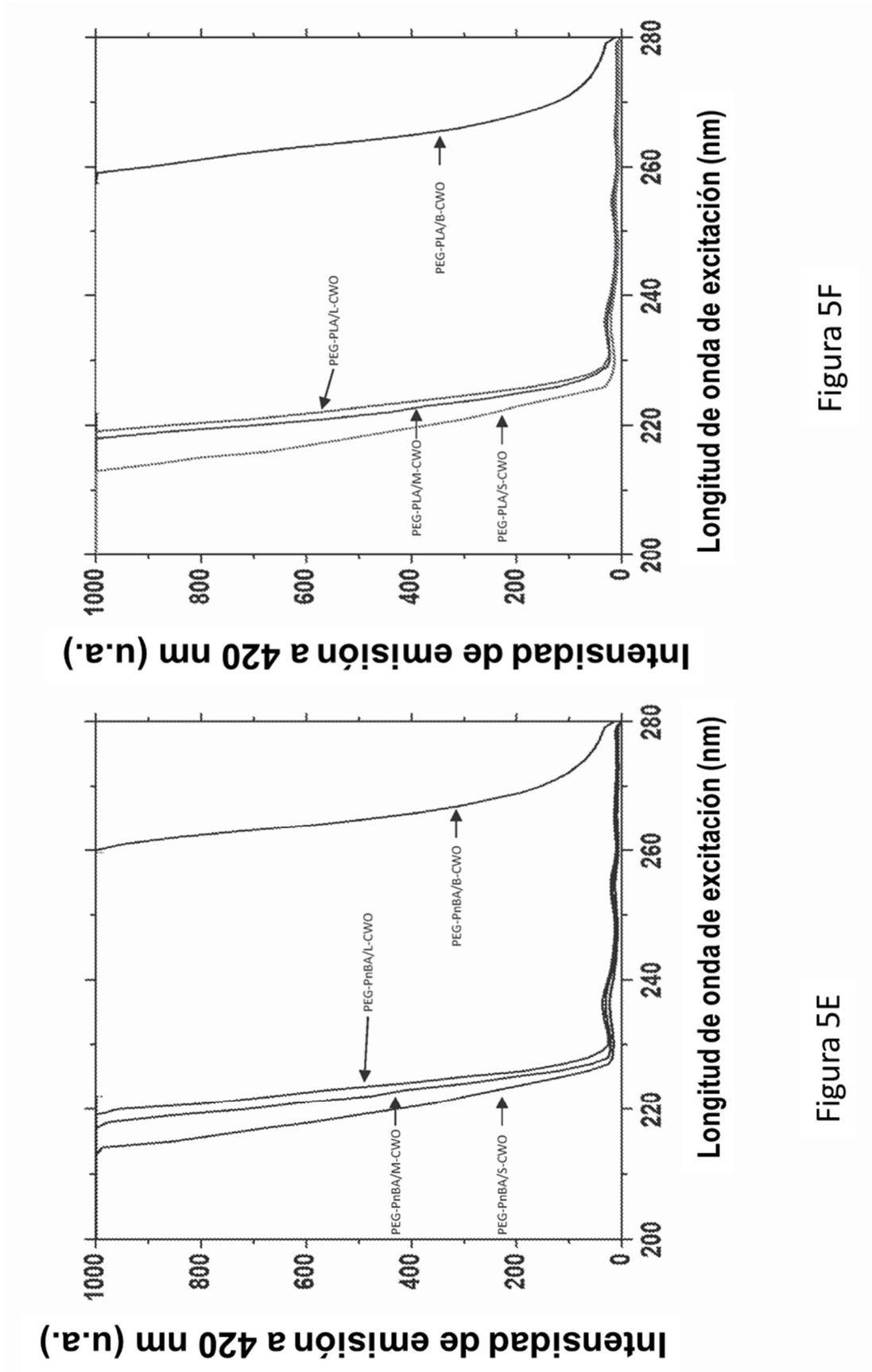


Figura 5F

Figura 5E

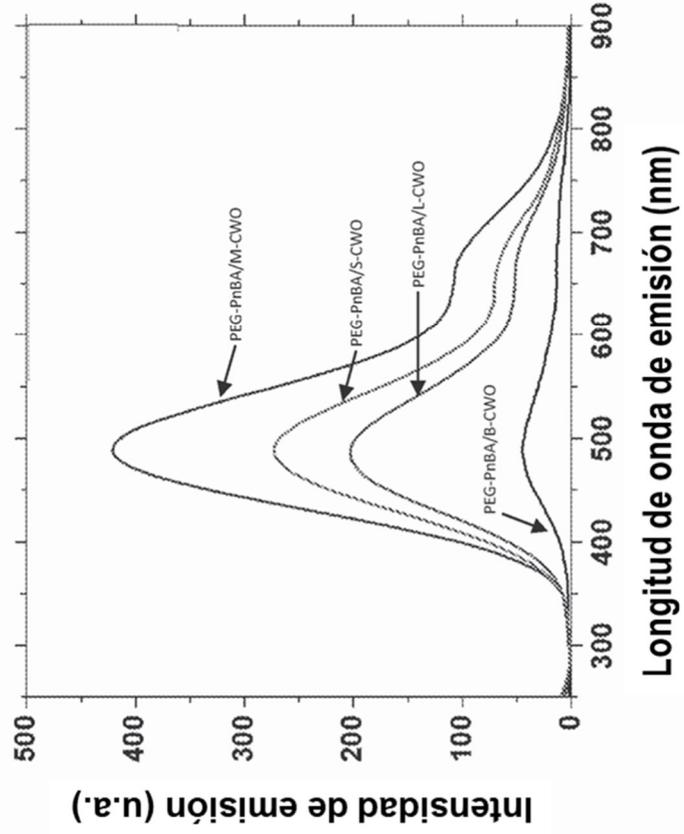


Figura 6B

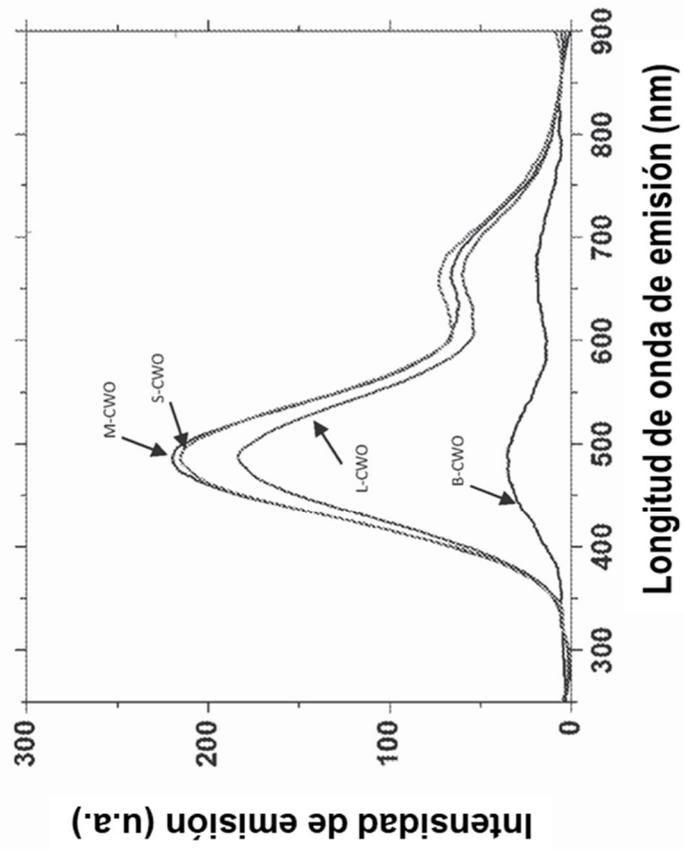
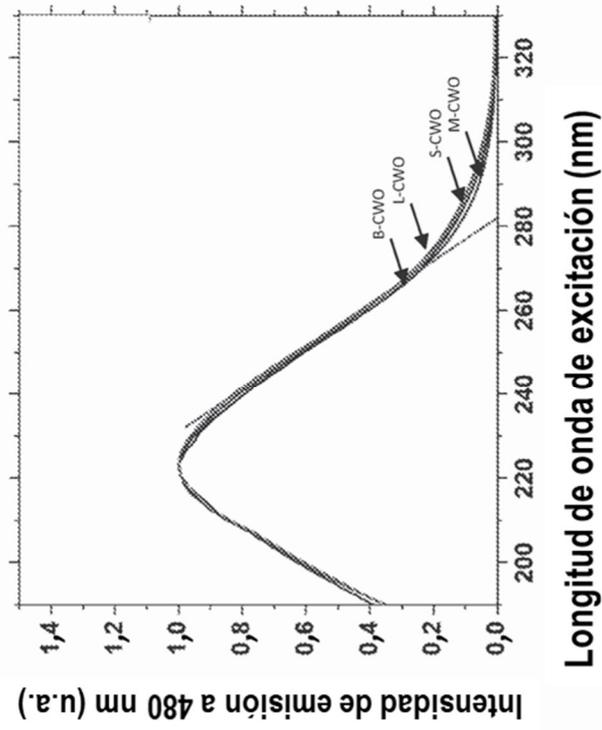
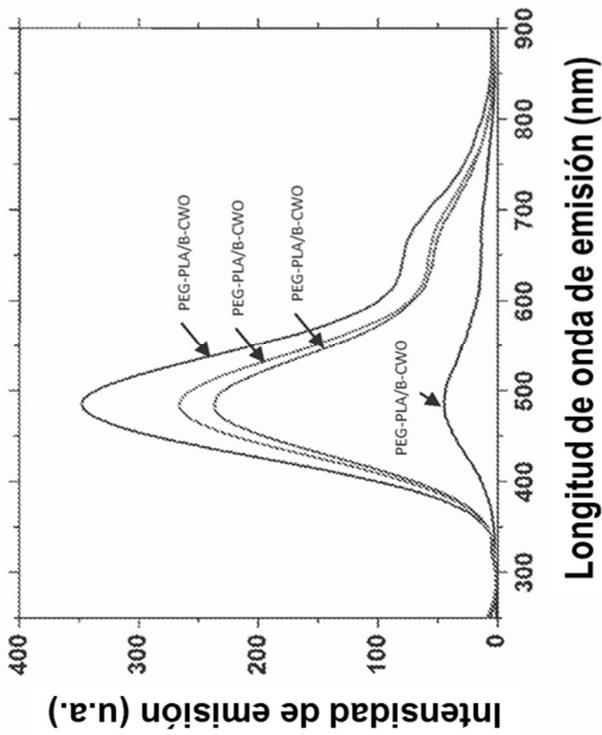


Figura 6A



Longitud de onda de excitación (nm)



Longitud de onda de emisión (nm)

Figura 6D

Figura 6C

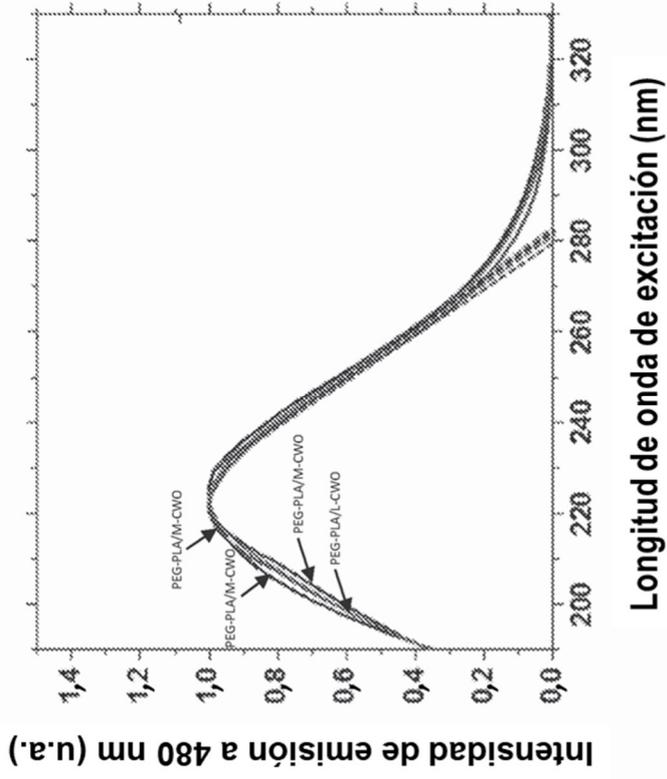


Figura 6F

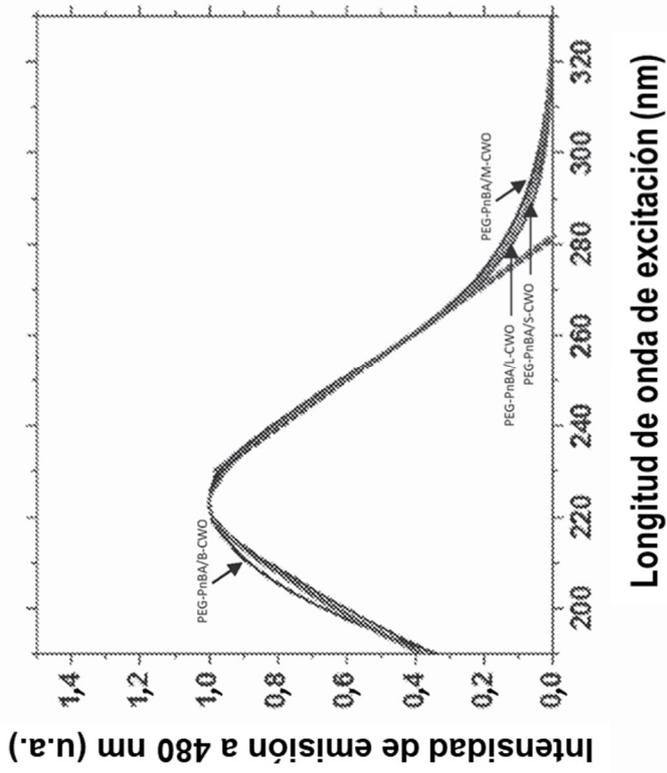


Figura 6E

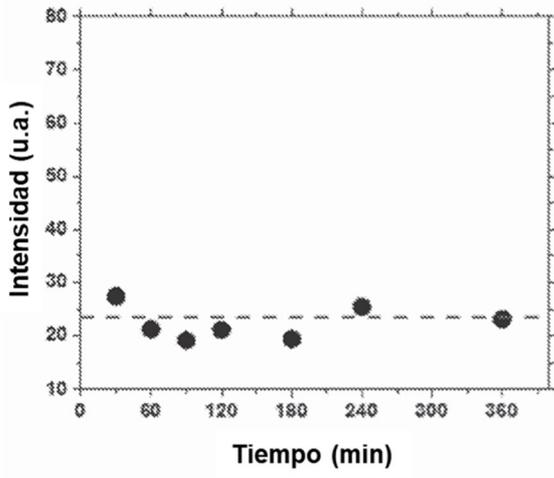


Figura 7A

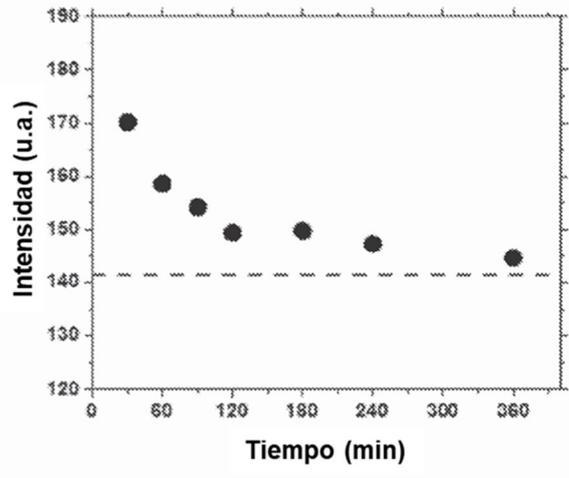


Figura 7B

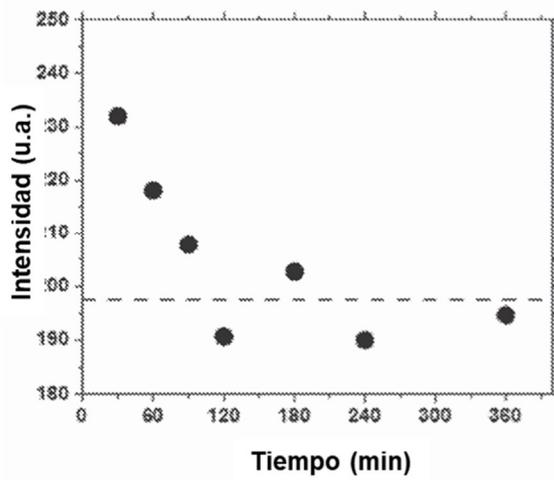


Figura 7C

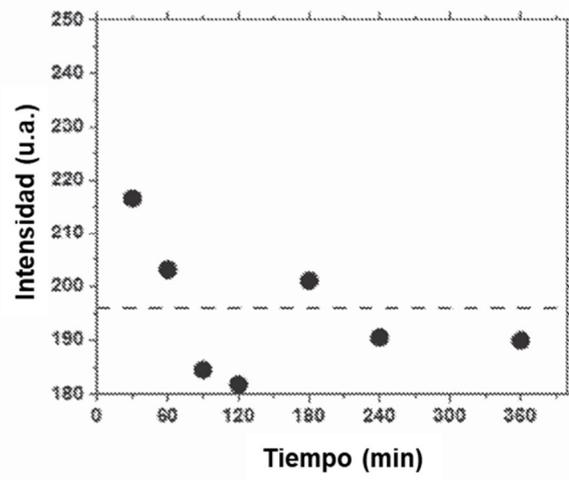


Figura 7D

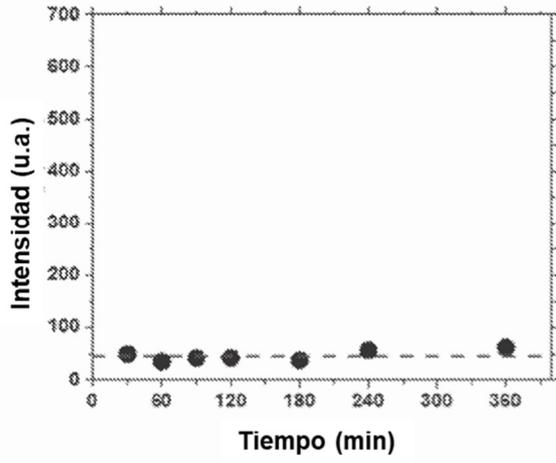


Figura 7E

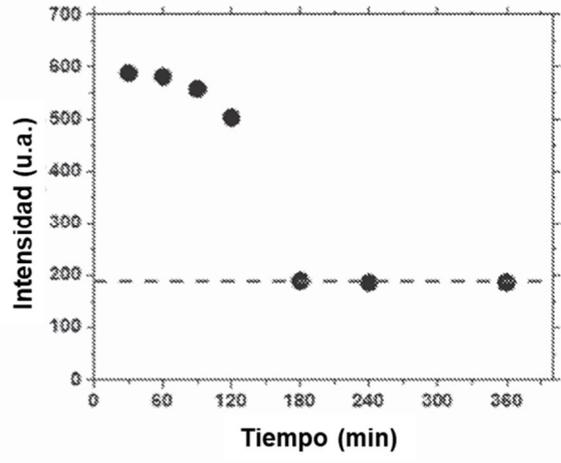


Figura 7F

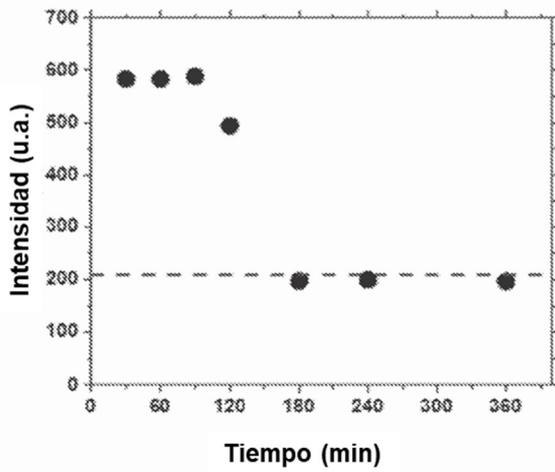


Figura 7G

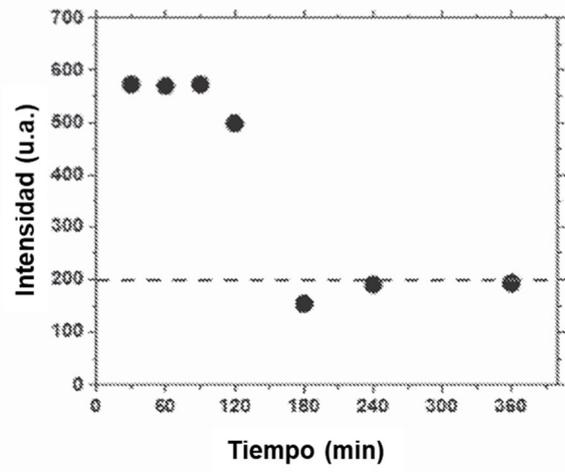


Figura 7H

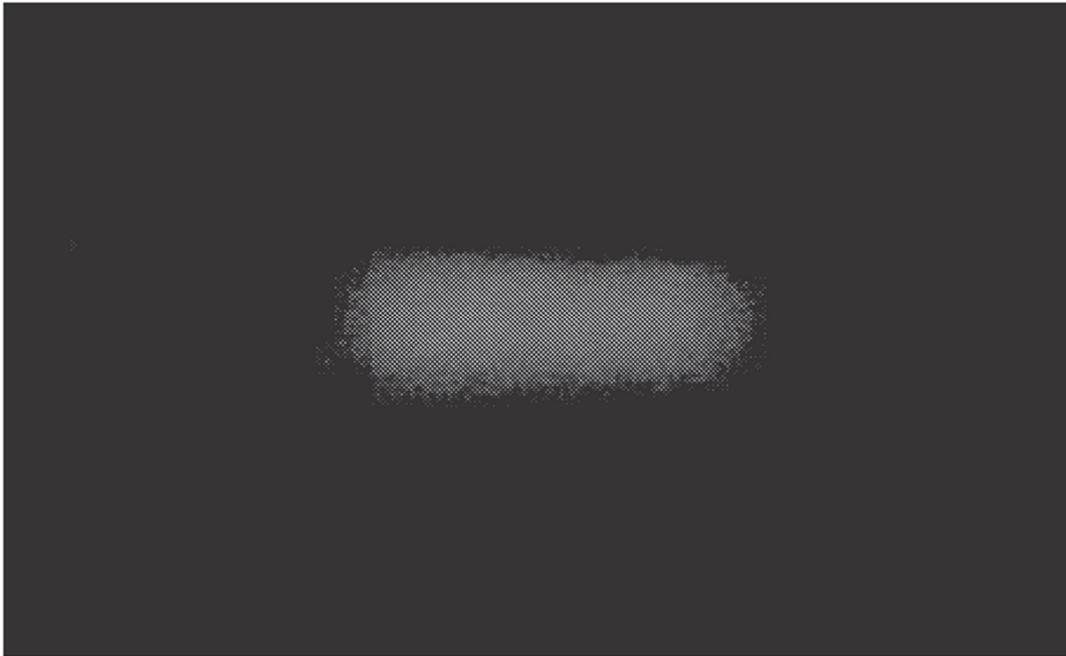


Figura 8A

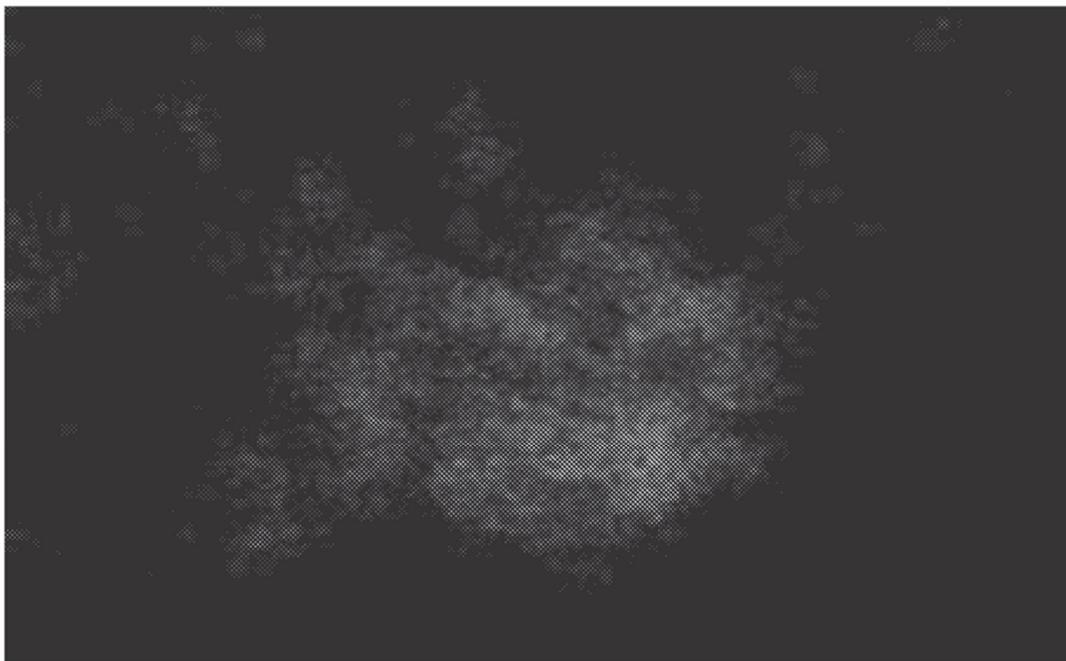


Figura 8B

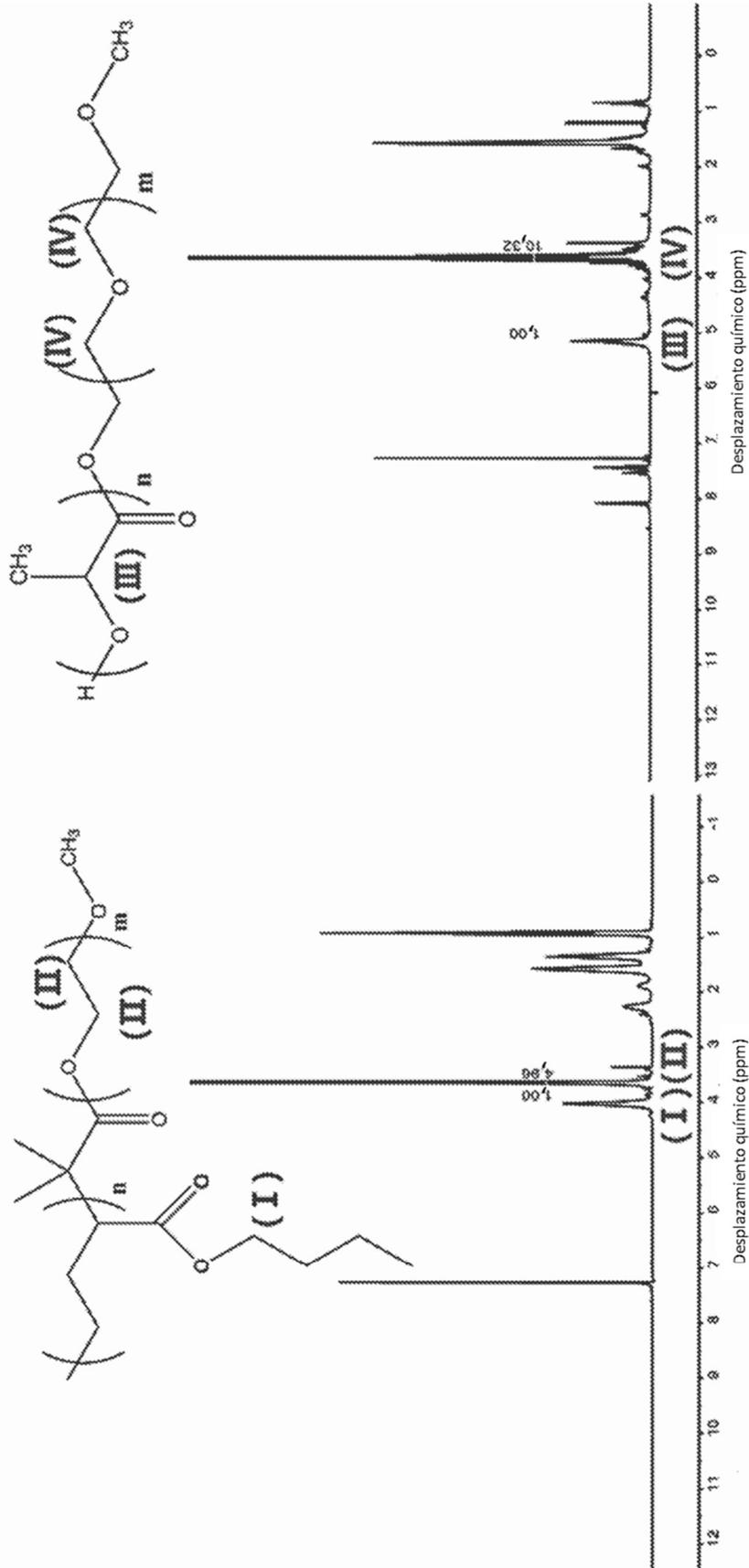


Figura 9B

Figura 9A

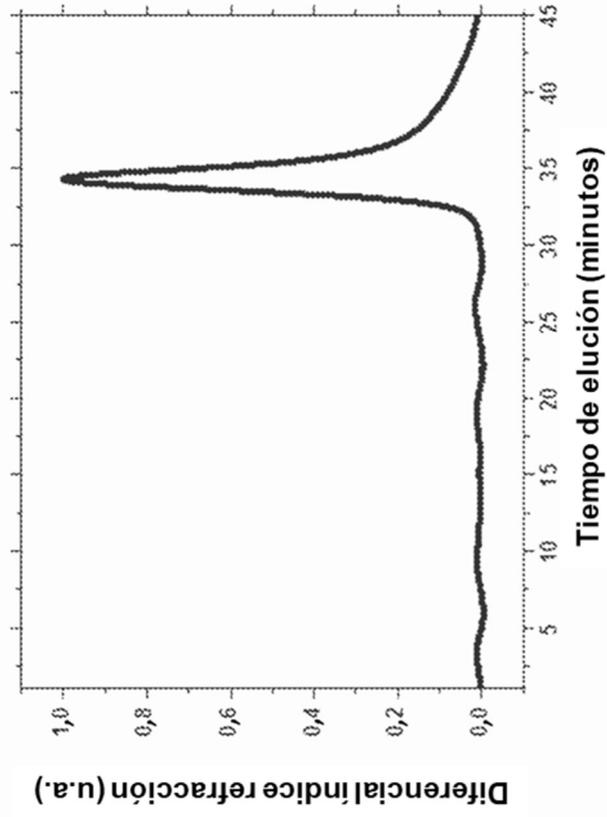


Figura 10B

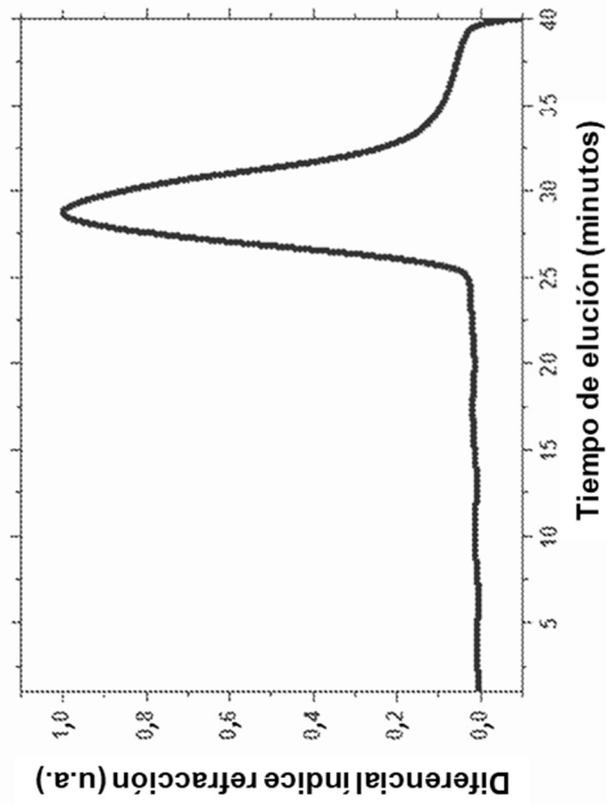


Figura 10A

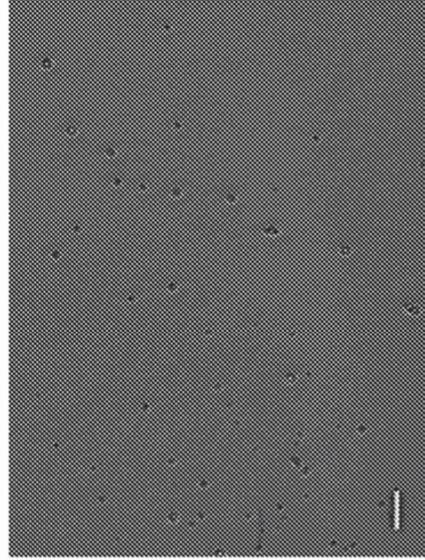


Figura 11C



Figura 11B

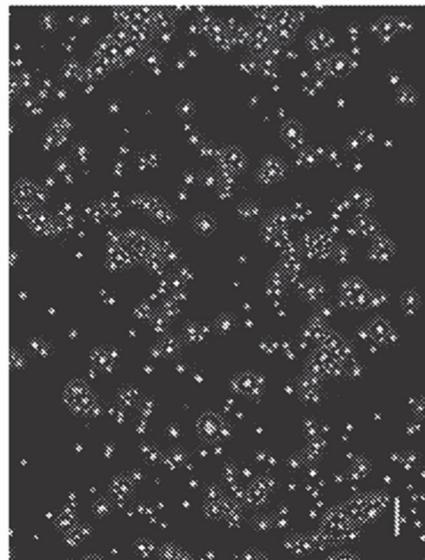


Figura 11A

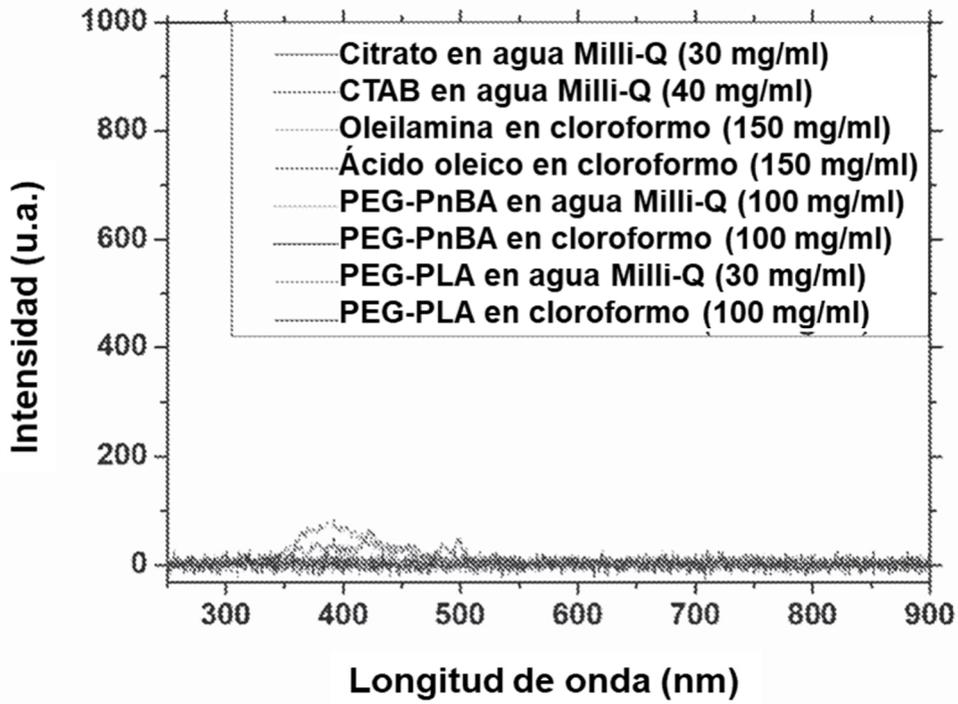


Figura 12A

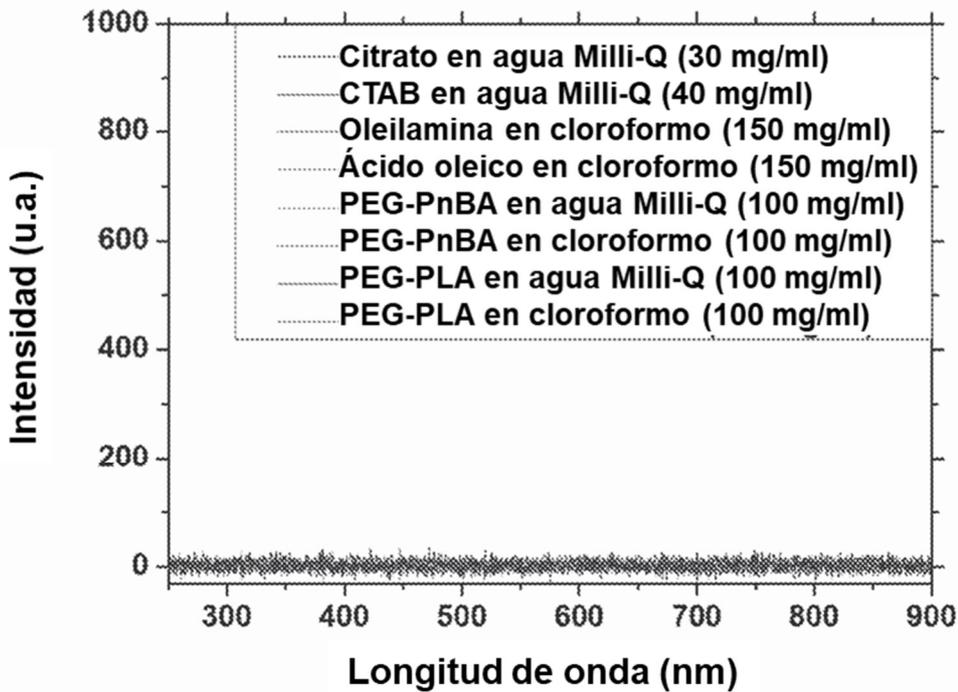


Figura 12B

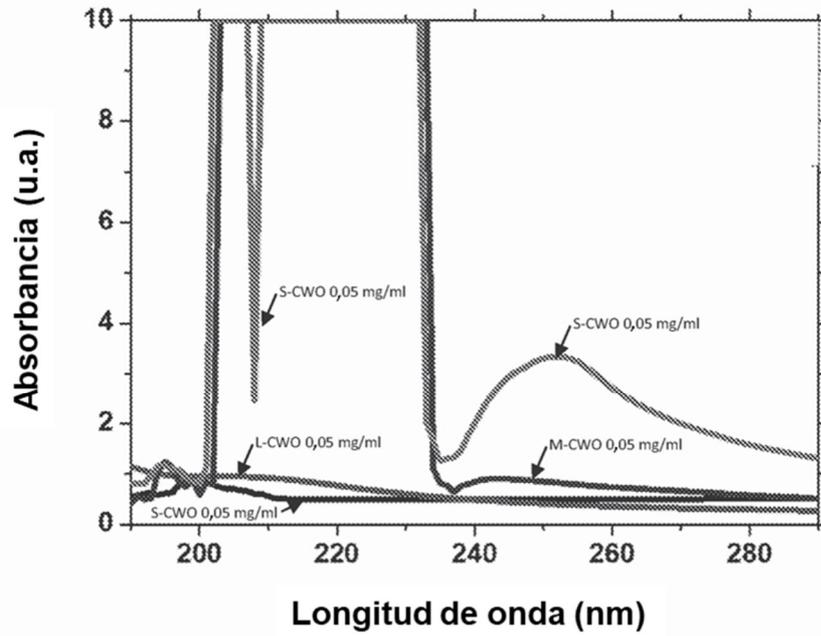


Figura 13A

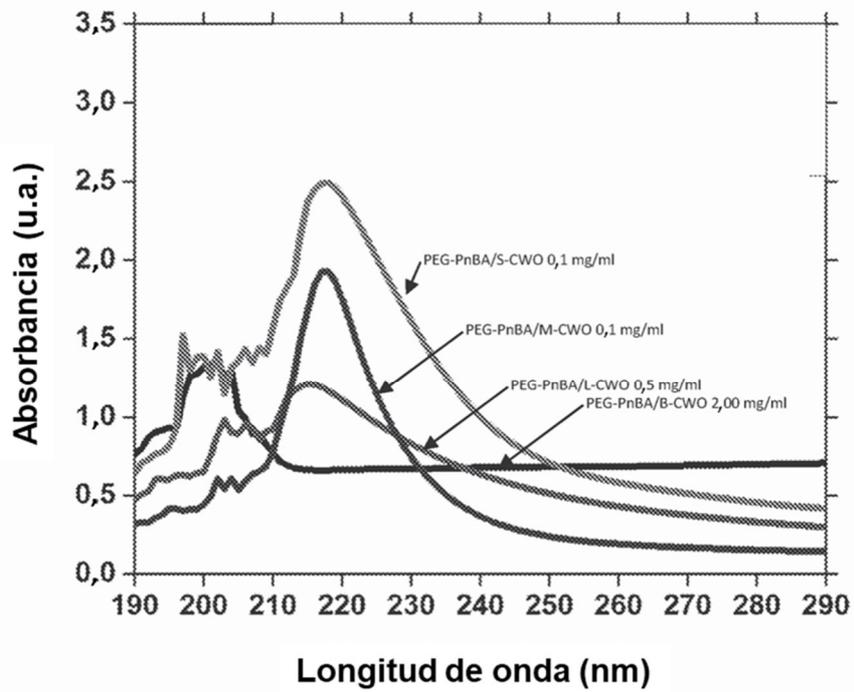


Figura 13B

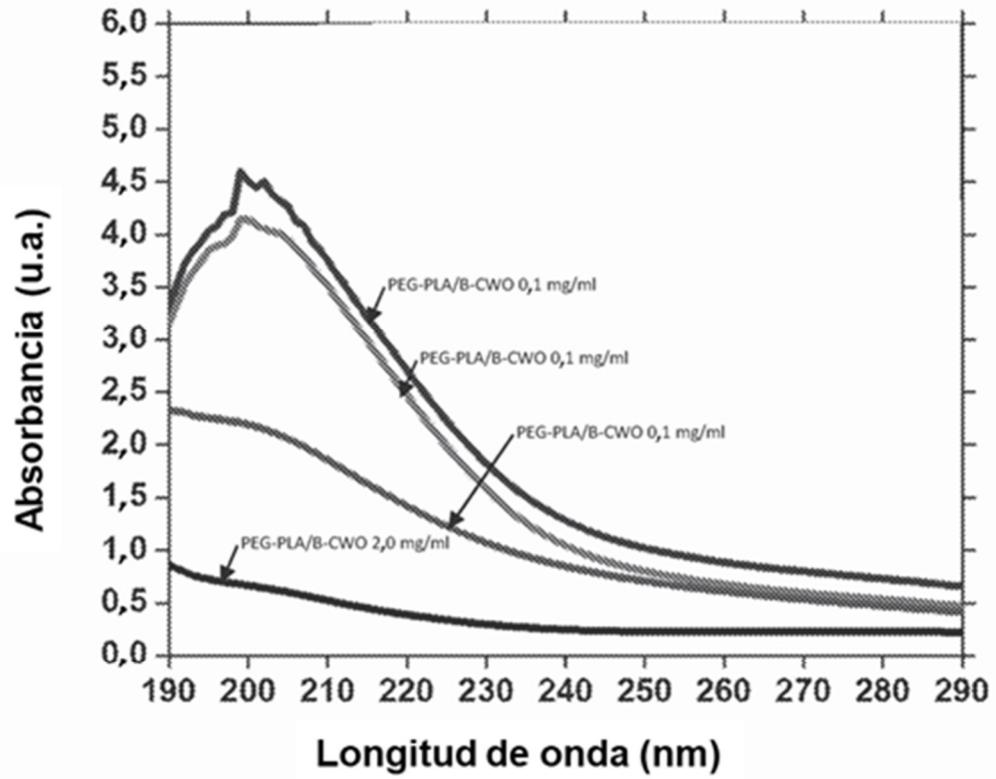


Figura 13c

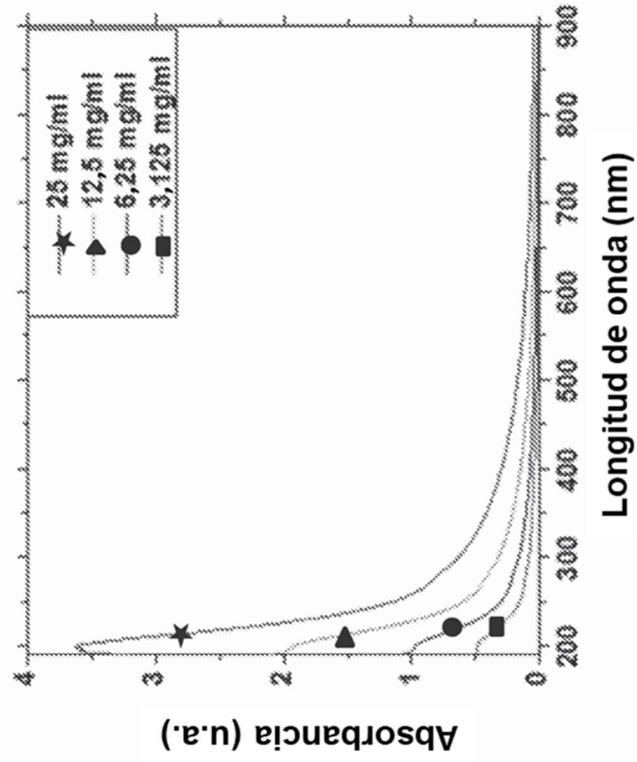


Figura 14B

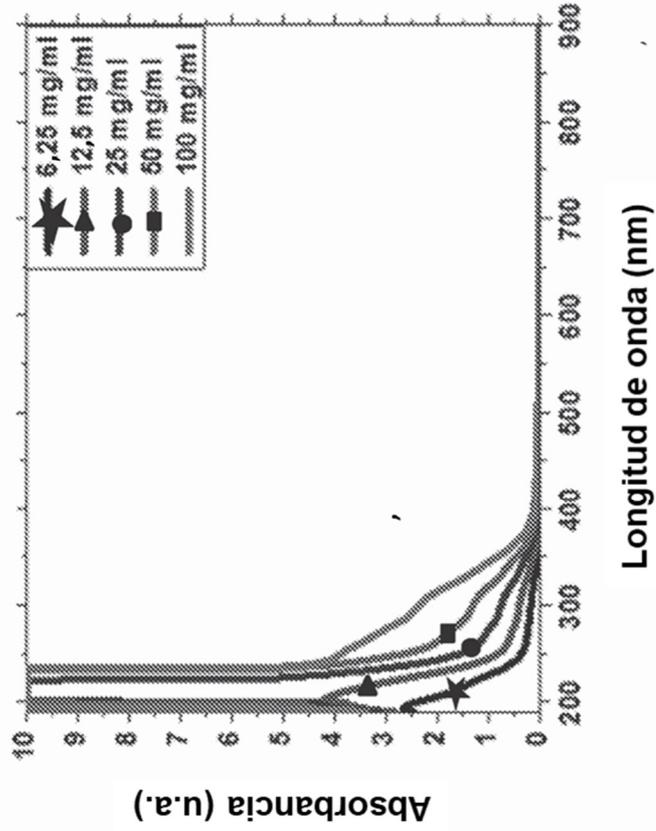


Figura 14A

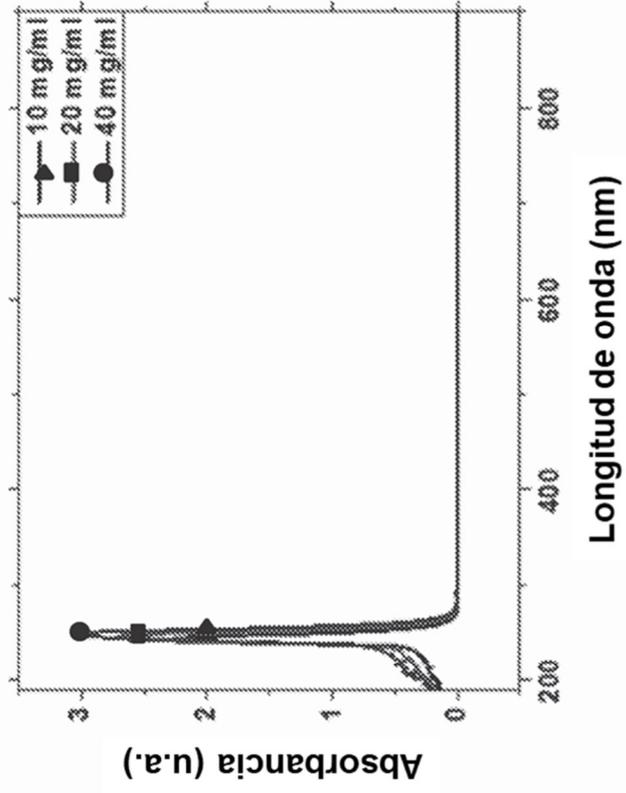


Figura 14D

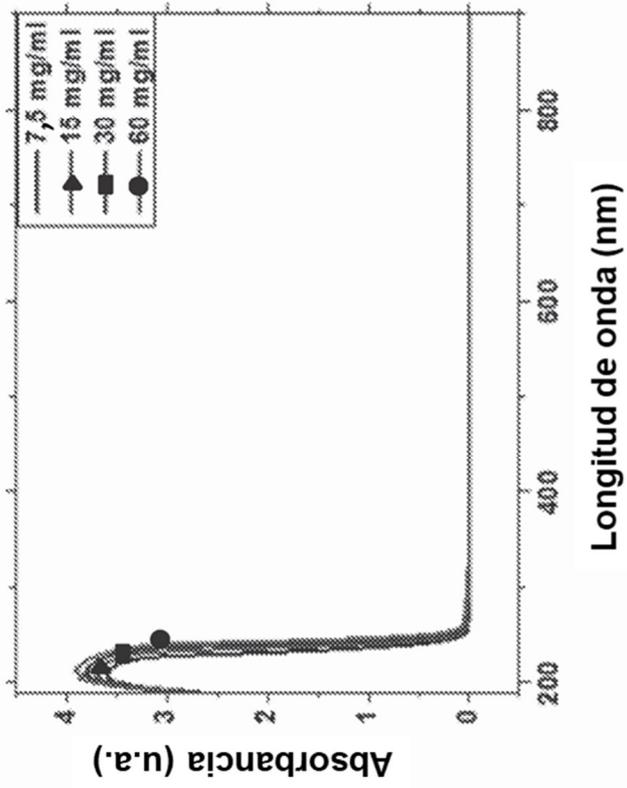


Figura 14C

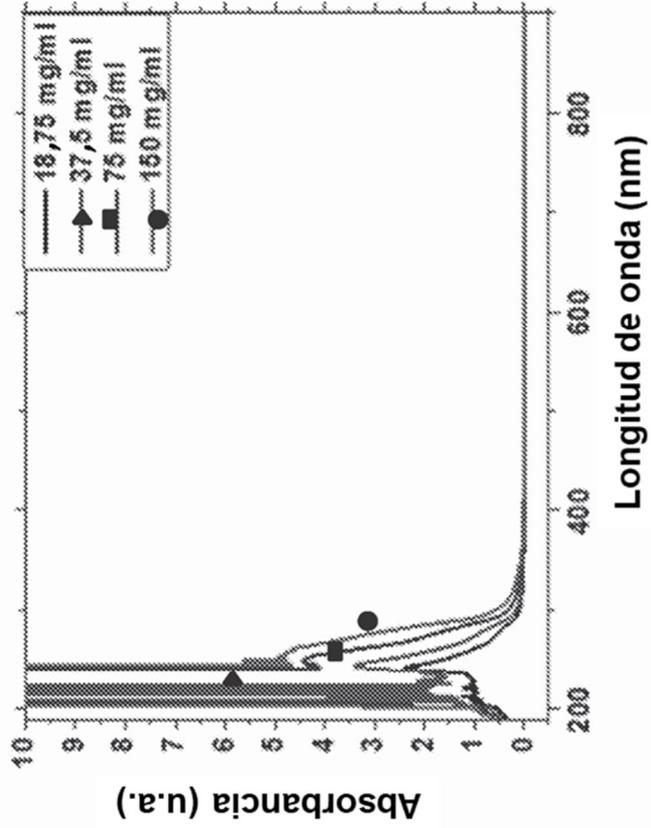


Figura 14F

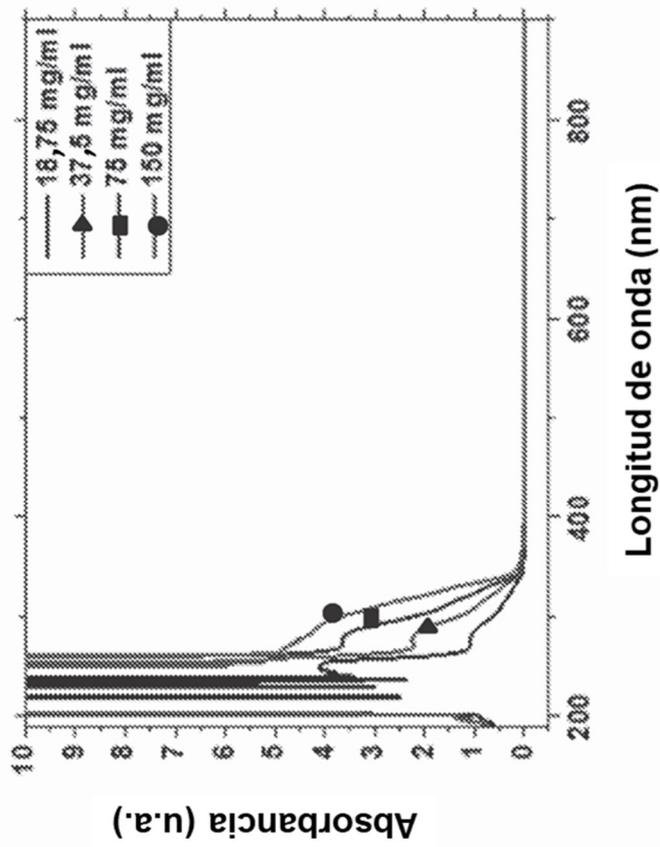


Figura 14E

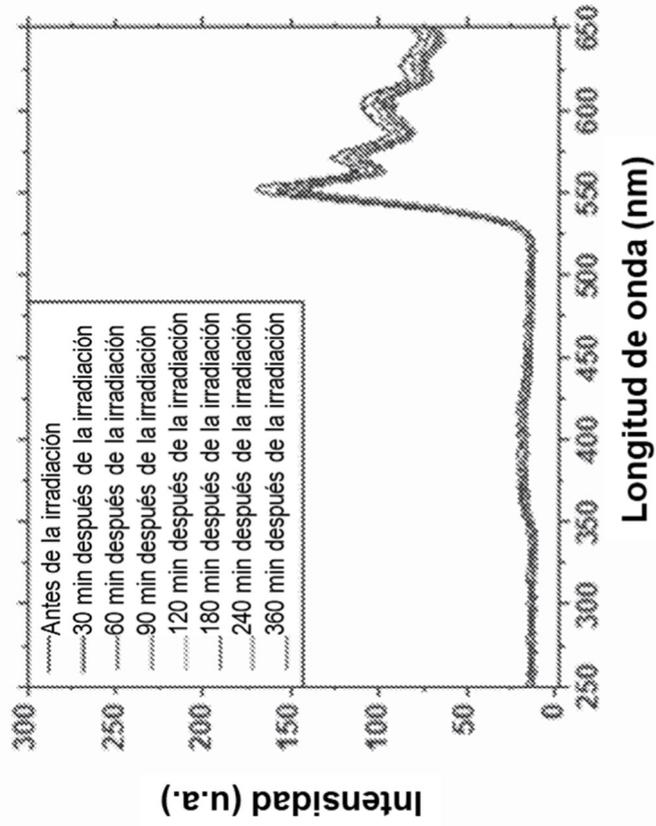


Figura 15Bc

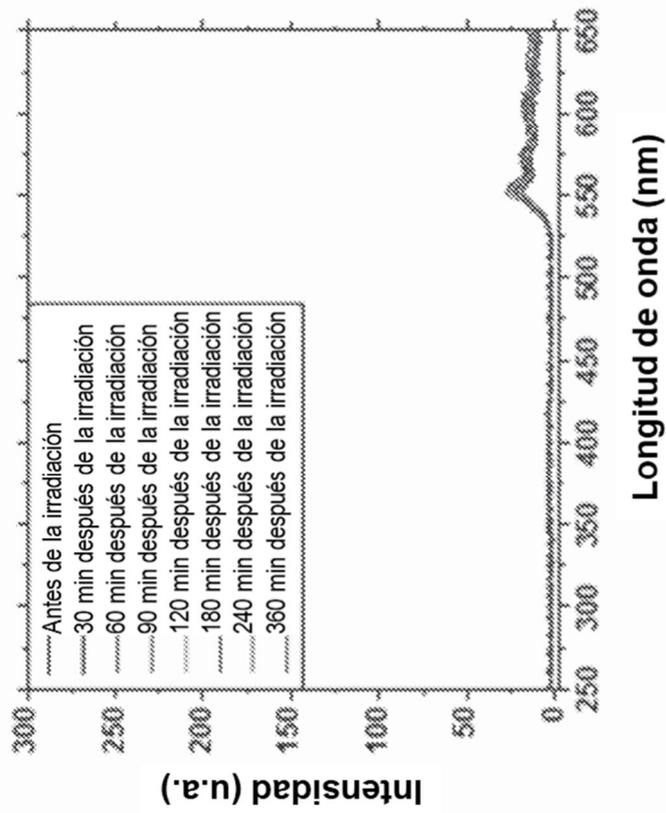


Figura 15A

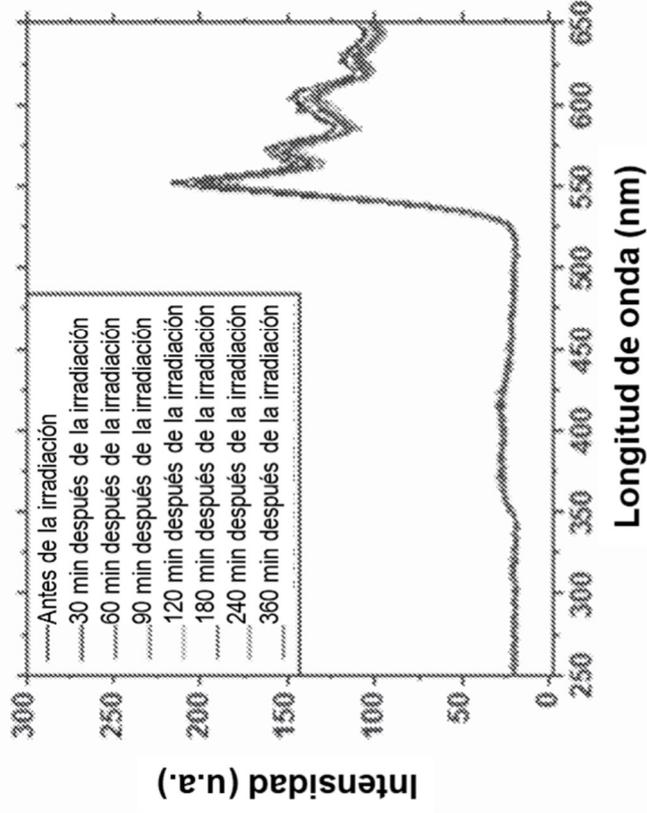


Figura 15Dc

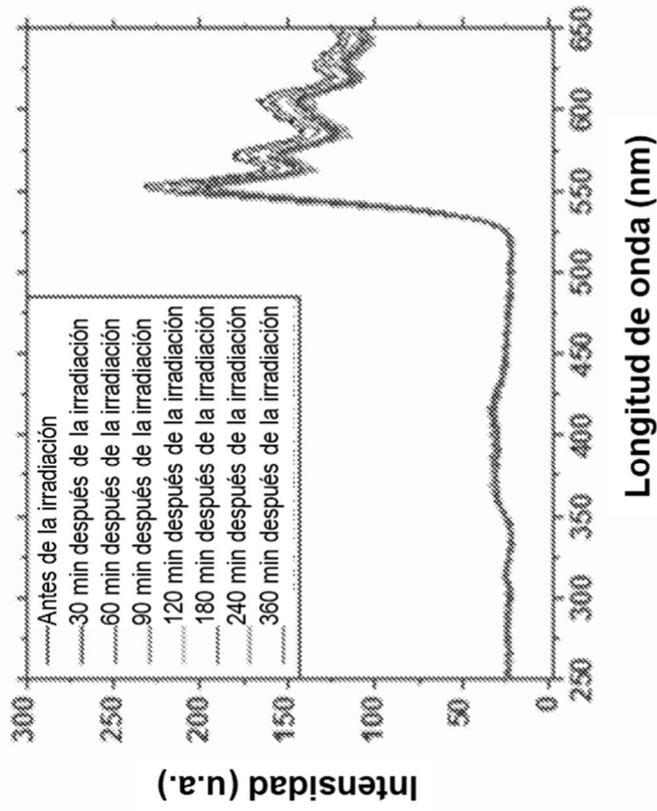


Figura 15C

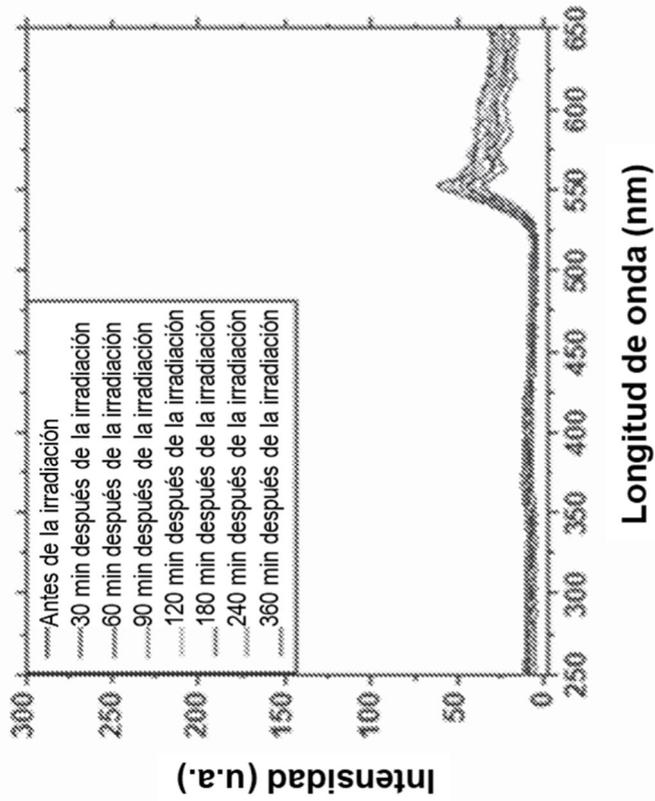
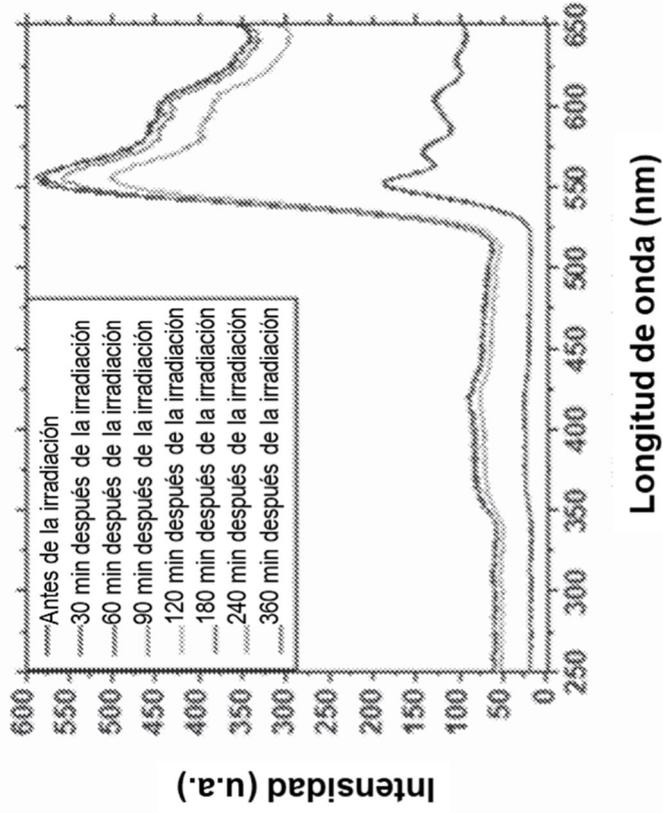


Figura 15F

Figura 15E

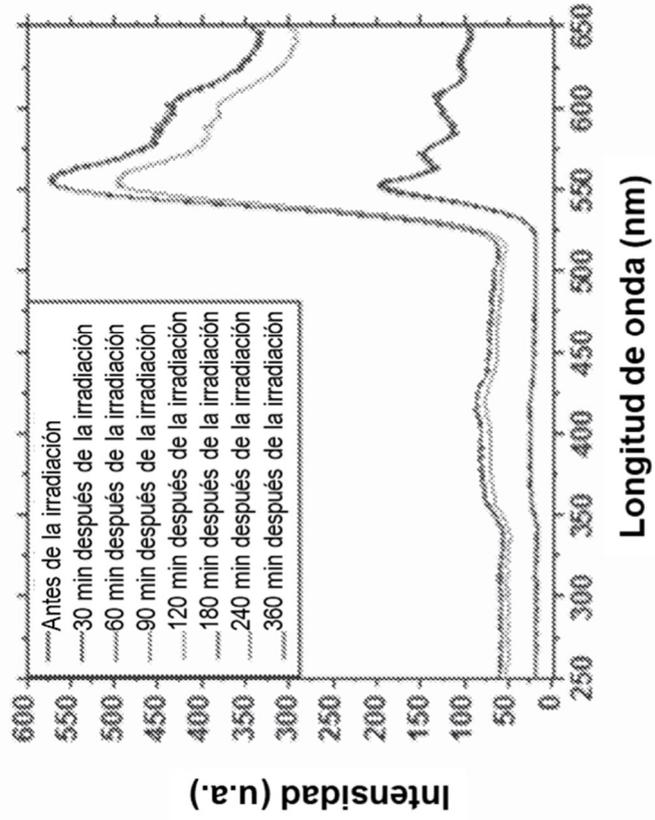


Figura 15H

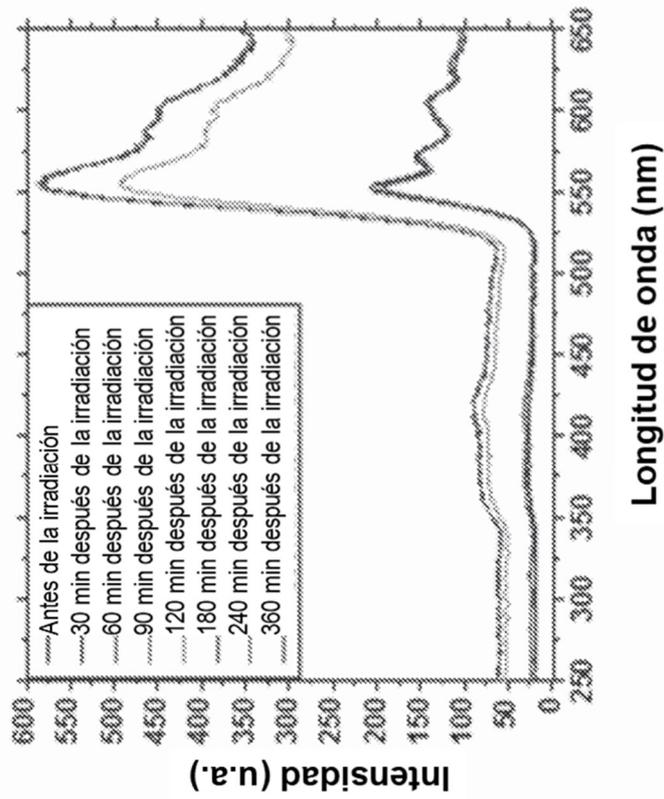


Figura 15G

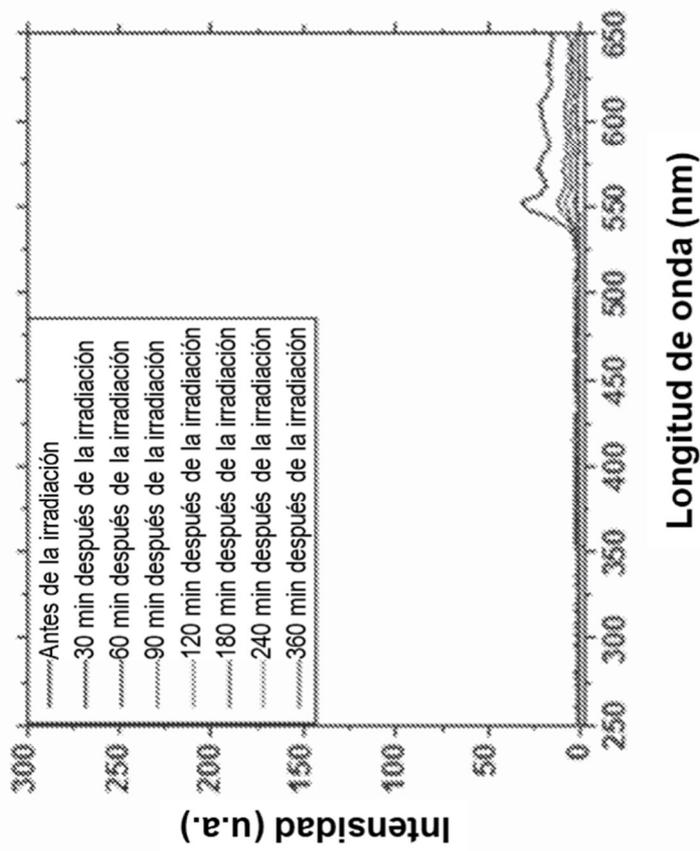
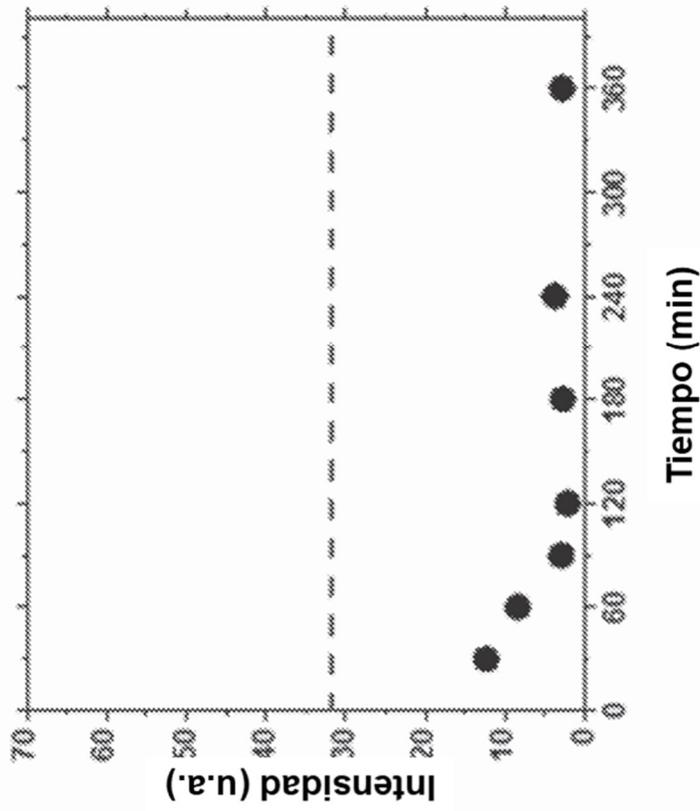
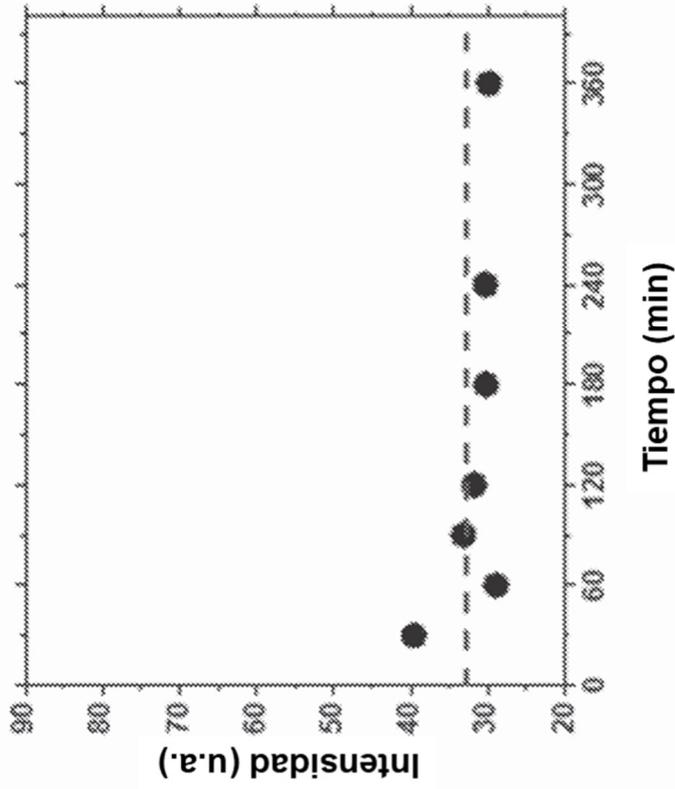


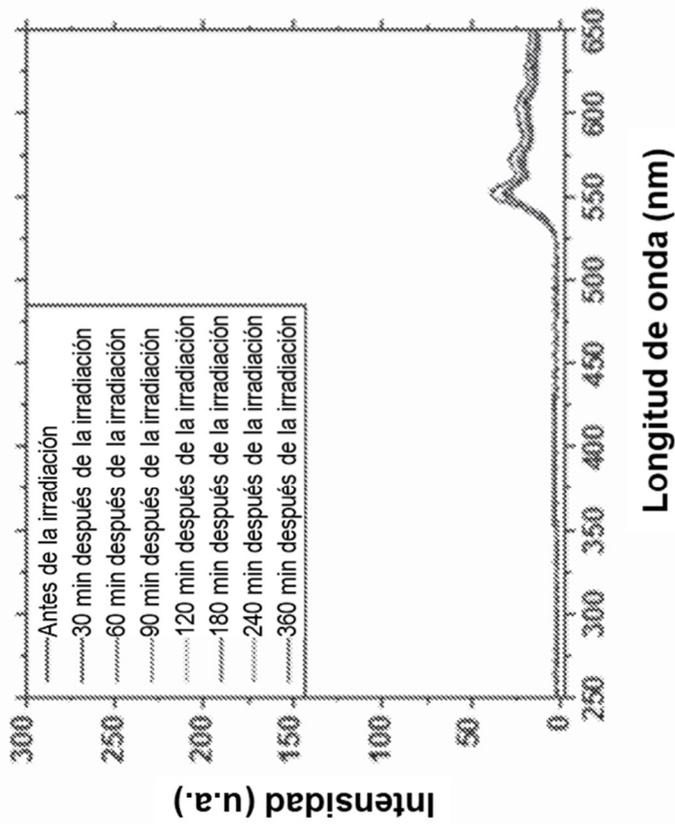
Figura 16Bc

Figura 16A



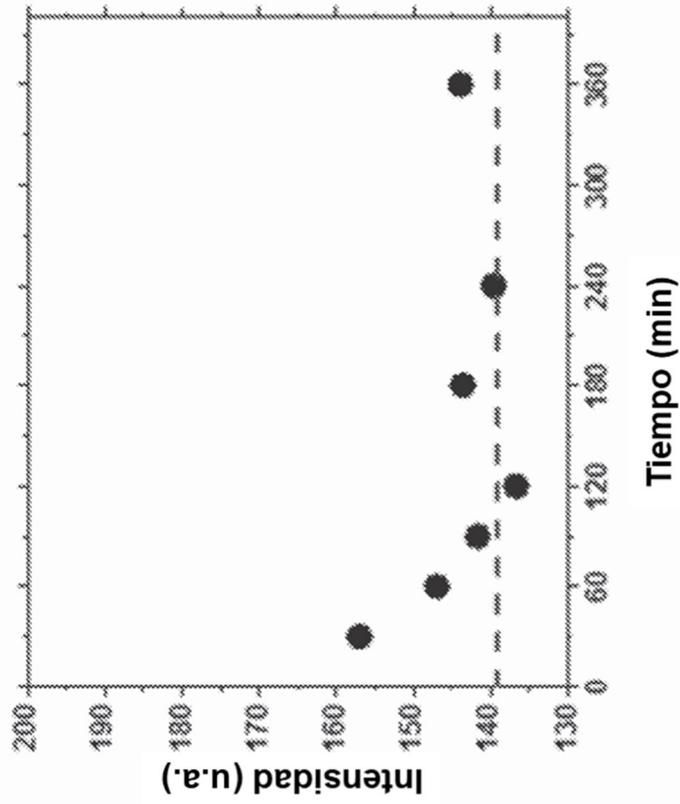
Tiempo (min)

Figura 16D



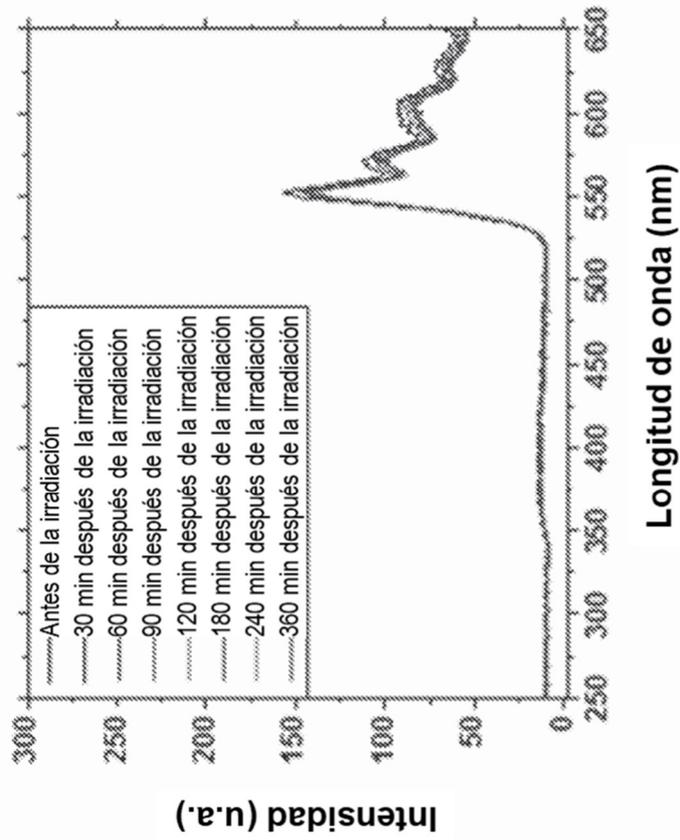
Longitud de onda (nm)

Figura 16C



Tiempo (min)

Figura 16F



Longitud de onda (nm)

Figura 16E

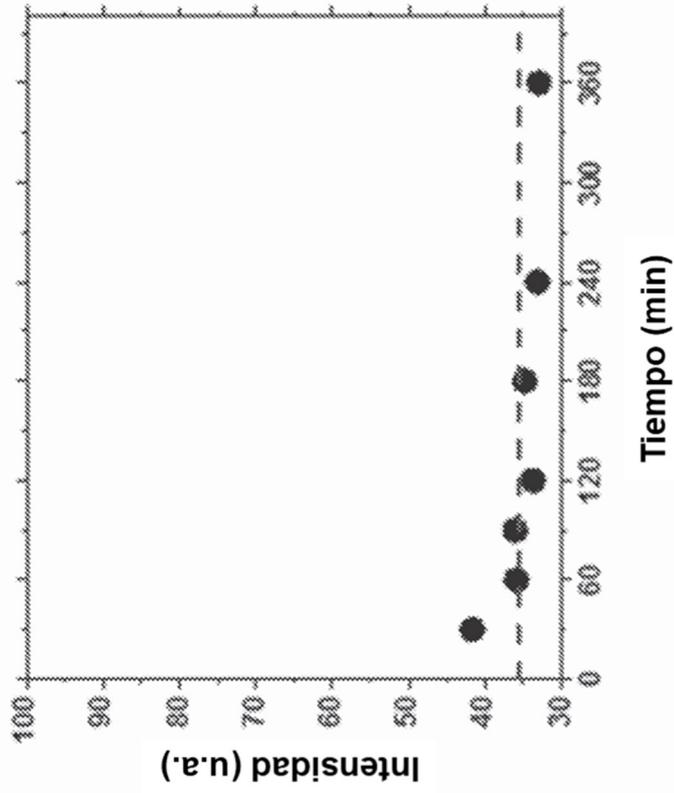


Figura 16H

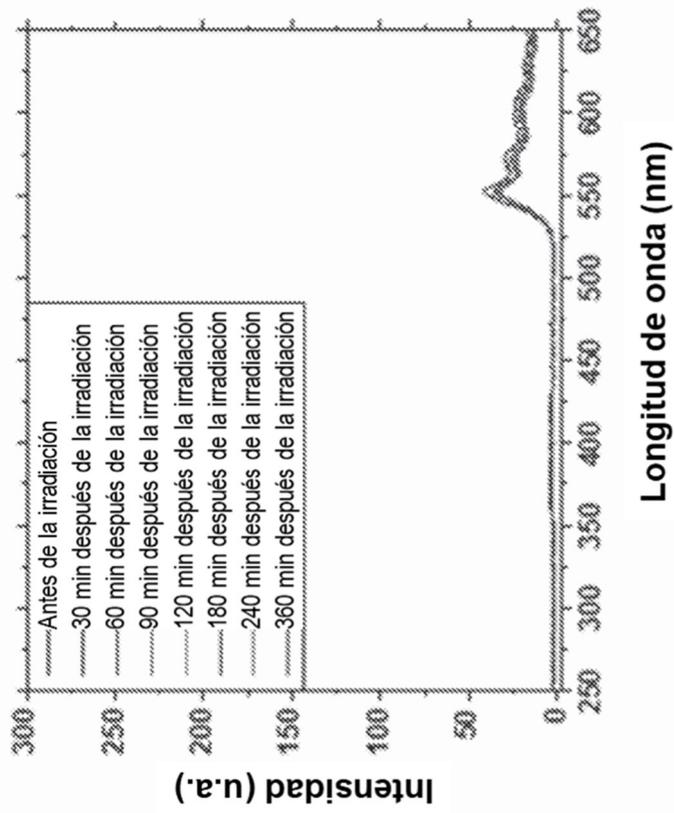
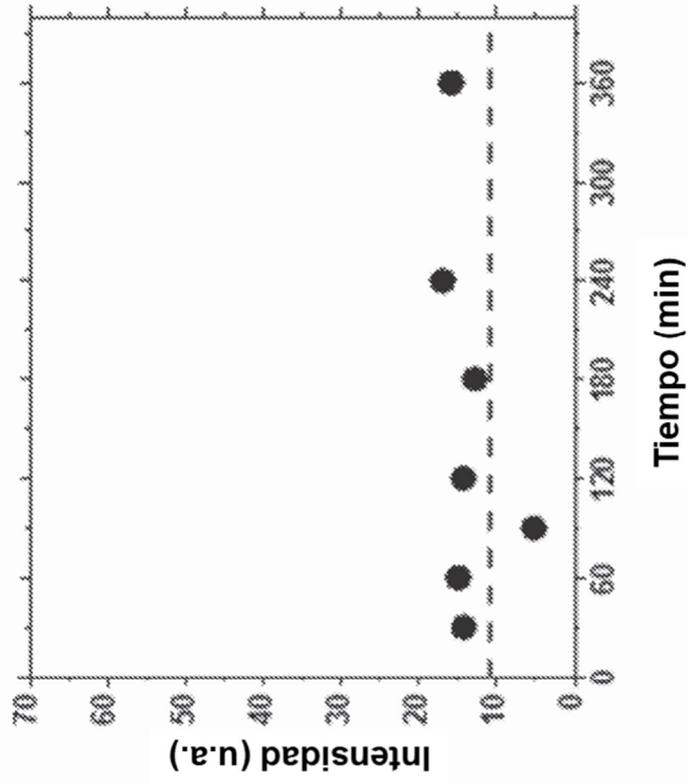
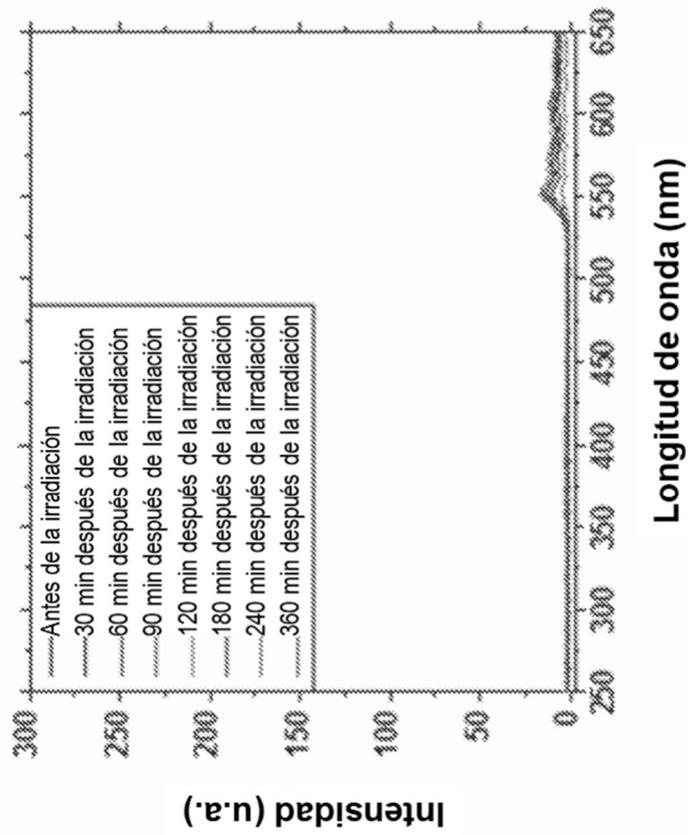


Figura 16G



Tiempo (min)

Figura 17B



Longitud de onda (nm)

Figura 17A

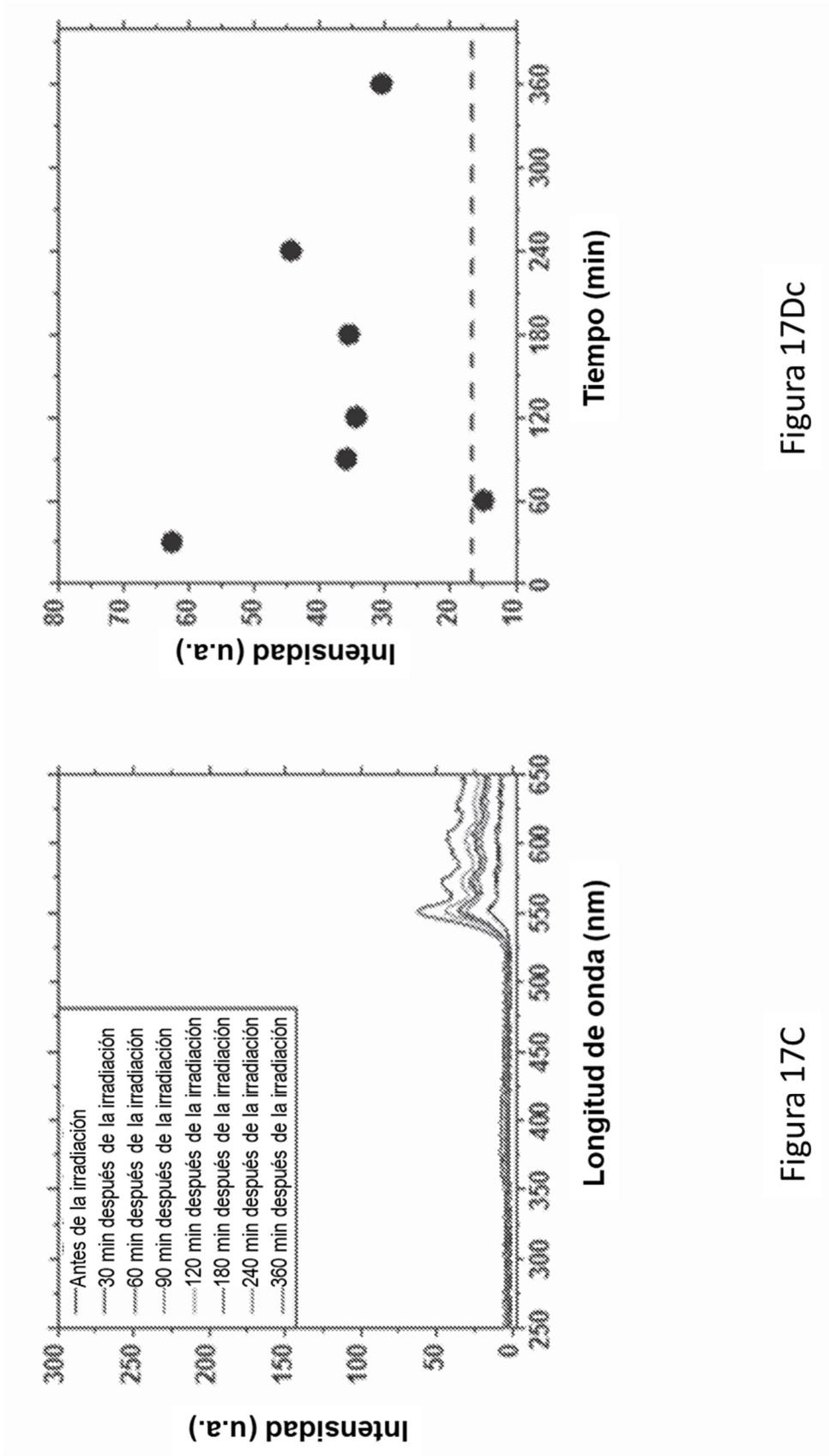


Figura 17Dc

Figura 17C

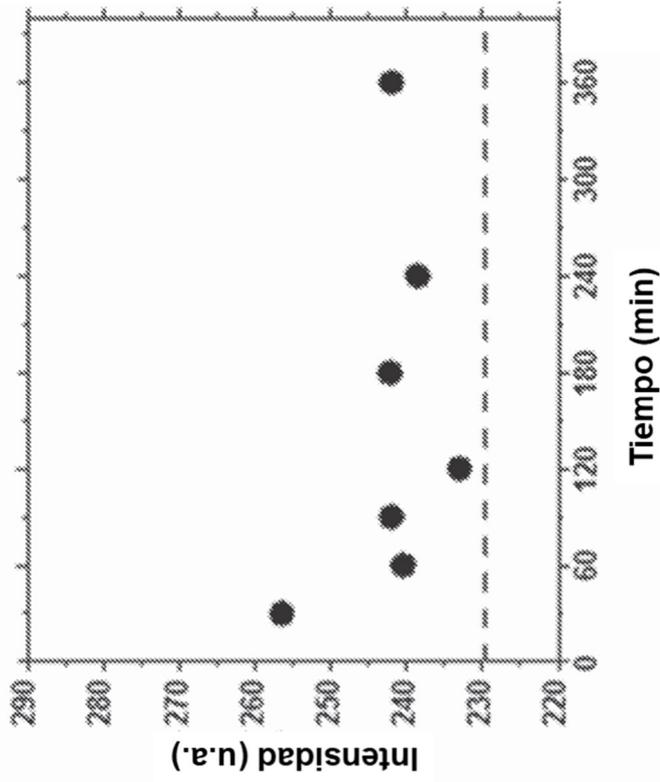


Figura 17F

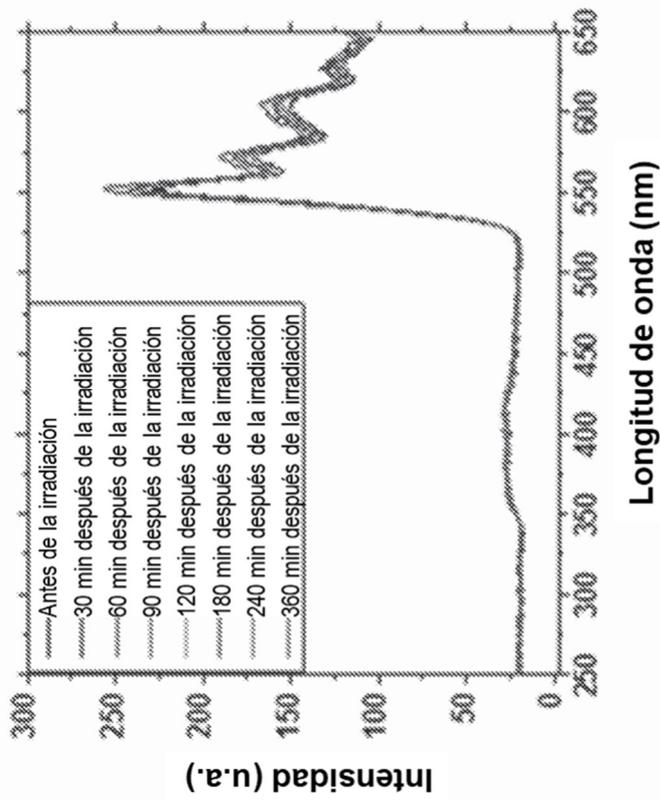


Figura 17E

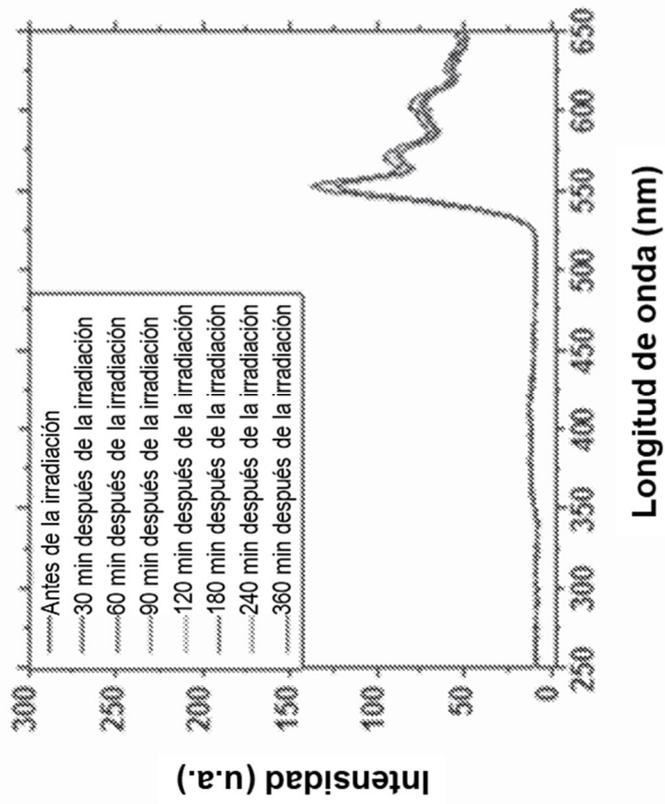


Figura 17G

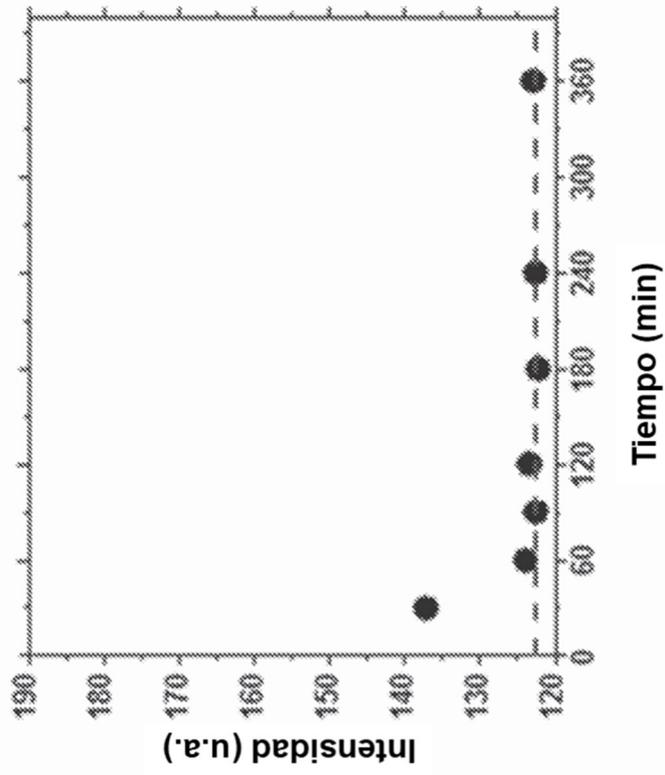


Figura 17H

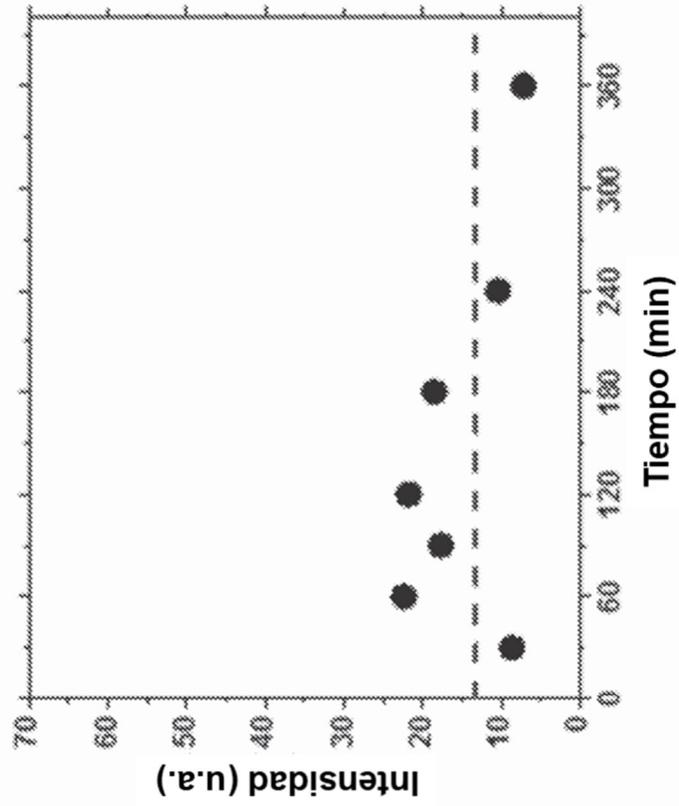


Figura 18B

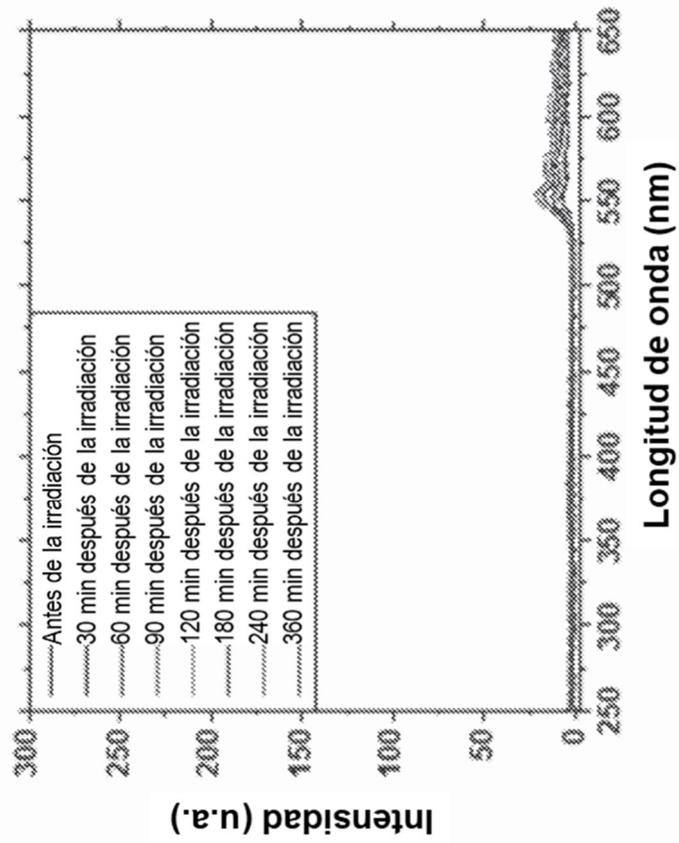
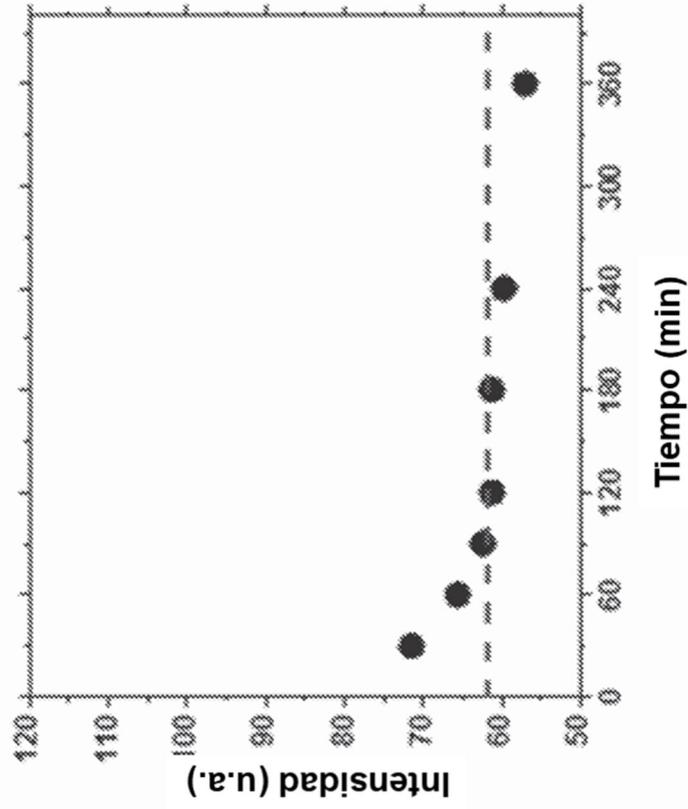
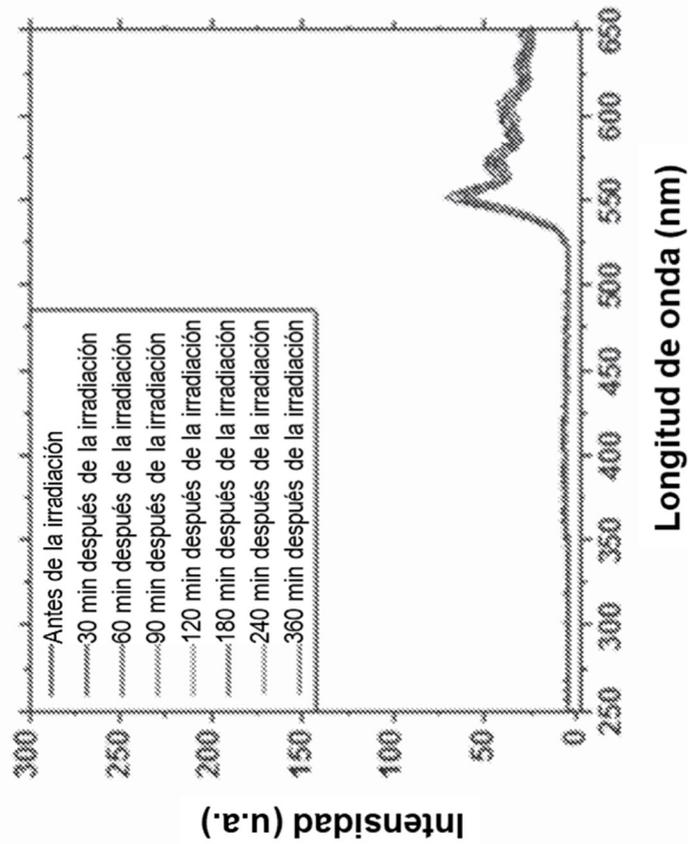


Figura 18A



Tiempo (min)



Longitud de onda (nm)

Figura 18D

Figura 18C

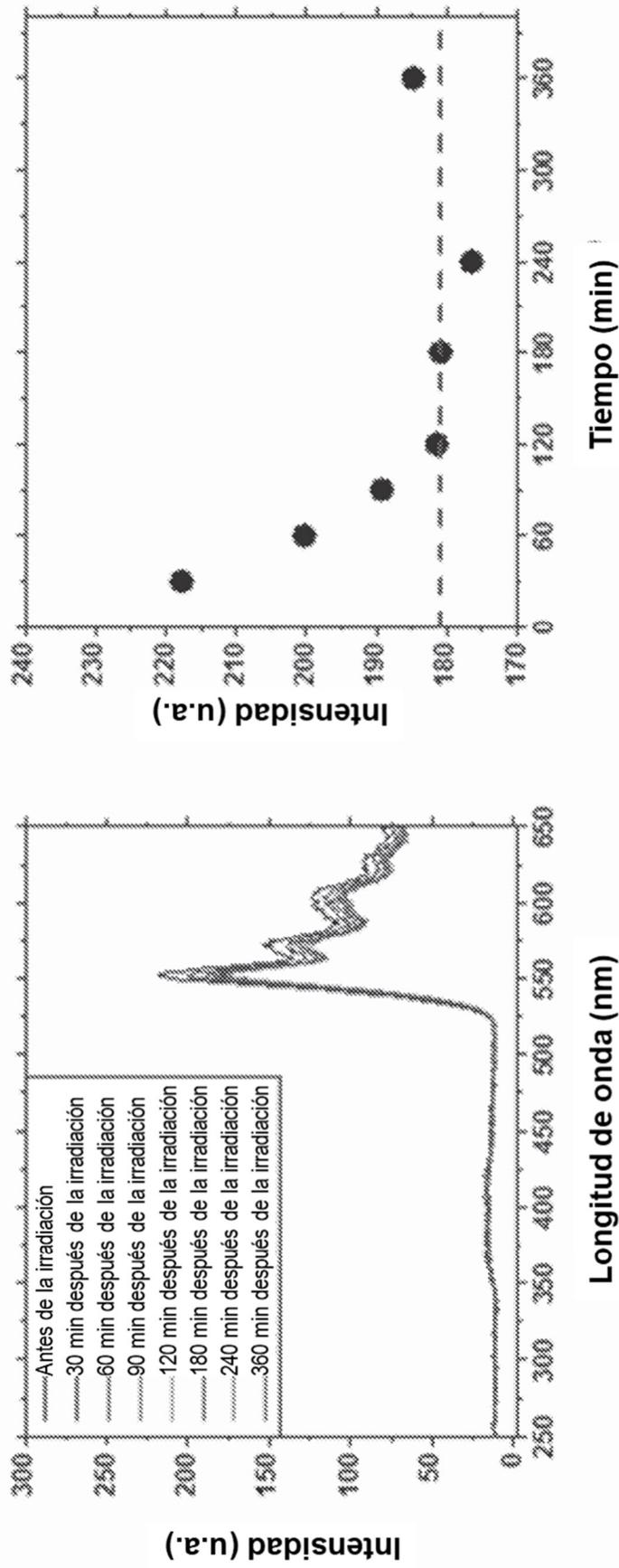


Figura 18F

Figura 18E

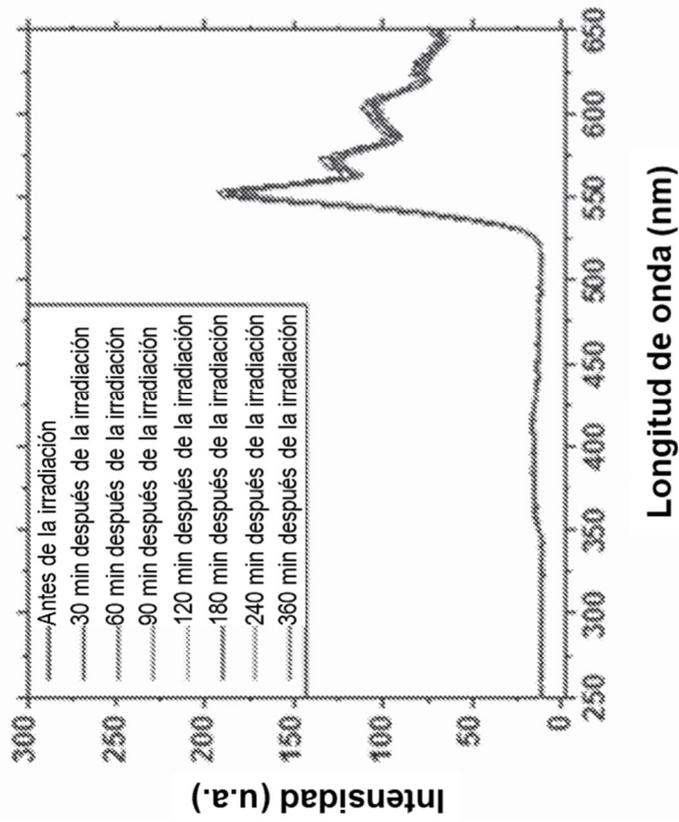


Figura 18G

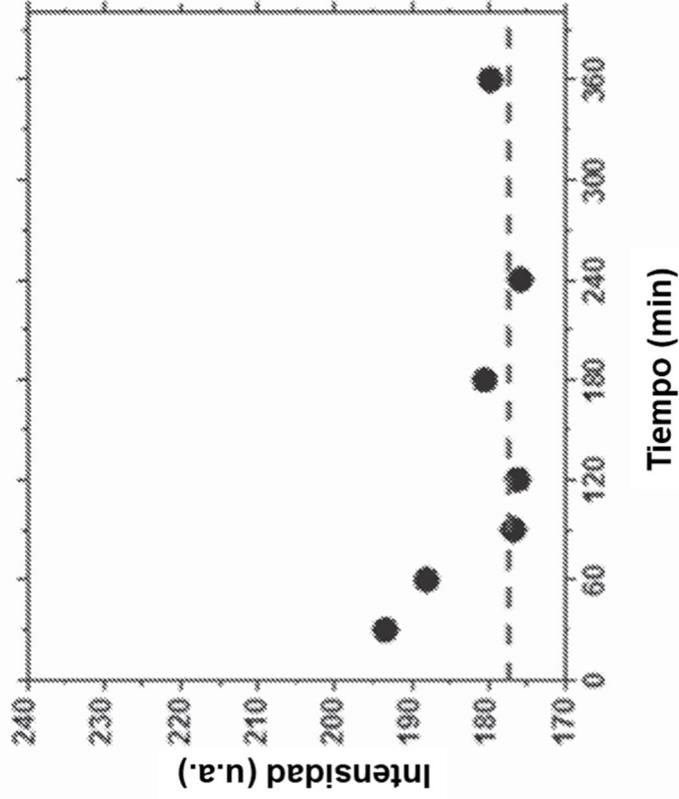


Figura 18H