

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 022**

51 Int. Cl.:  
**A61K 41/00** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08022155 .9**  
96 Fecha de presentación: **19.12.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2198885**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Nanopartículas de fosfato de calcio como vehículo de colorantes para la terapia fotodinámica**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.05.2012**

73 Titular/es:  
**BIOLITEC AG  
WINZERLAER STRASSE 2A  
07745 JENA, DE y  
UNIVERSITAT DUISBURG-ESSEN**

72 Inventor/es:  
**Albrecht, Volker;  
Gitter, Burkhard;  
Graefe, Susanna;  
Wiehe, Arno;  
Epple, Matthias;  
Schwiertz, Janine y  
Kathinvel, Ganesan**

74 Agente/Representante:  
**Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 381 022 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

Nanopartículas de fosfato de calcio como vehículo de colorantes para la terapia fotodinámica.

Antecedentes de la invención

## 1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la preparación de formulaciones de nanopartículas que contienen fotosensibilizadores hidrófobos o hidrófilos, y su uso en la terapia fotodinámica, en particular para la terapia tumoral y antibacteriana, utilizando administración intravenosa o tópica.

## 2. Declaración de divulgación de la invención

10 Las nanopartículas de fosfato de calcio han ganado un creciente interés en los últimos años debido a su alta biocompatibilidad, debido al hecho de que el fosfato de calcio constituye el mineral inorgánico de los huesos y dientes de los mamíferos (S.V. Dorozhkin, M. Eppe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 3130-3146; M. Vallet-Regi, *Dalton Trans.*, 2006, 5211-5220; C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, *Mater. Sci. Eng., C*, 2007, 27, 198-5220).

15 Las nanopartículas de fosfato de calcio pueden actuar también como vehículos de fármacos, por ejemplo, para los ácidos nucleicos (V. Sokolova, M. Eppe, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 1382-1395) o para fármacos antitumorales (B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, 17, 2180-2188; E. Boanini, M. Gazzano, K. Rubini, A. Bigi, *Adv. Mater.*, 2007, 19, 2499-2502; X. Cheng, L. Kuhn, *Int. J. Nanomed.* 2007, 2, 667-674). Por ejemplo, se logró una exitosa transfección de células con nanopartículas de fosfato de calcio recubiertas con ADN y siARN (A. Maitra, *Exp. Rev. Mol. Diagn.*, 2005, 5, 893-905; Y. Kakizawa, S. Furukawa, A. Ishii, K. Kataoka, *J. Controlled Release*, 2006, 111, 368-370; V.V. Sokolova, I. Radtke, R. Heumann, M. Eppe, *Biomaterials*, 2006, 27, 3147-3153; D. Olton, J. Li, M.E. Wilson, T. Rogers, J. Close, L. Huang, N.P. Kumta, C. Sfeir, *Biomaterials*, 2007, 28, 1267-1279; V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak, W. Meyer-Zaika, E.A. Kubareva, E.A. Romanova, T.S. Oretskaya, R. Heumann, M. Eppe, *J. Mater. Chem.*, 2007, 17, 721-727). Otro ejemplo es el descrito en la Patente N° US 2008/0241256 A1 por Kuhn. Aquí se describen conjugados de agente activo y nanopartículas de fosfato de calcio adecuados para orientar la administración del agente activo en las células tumorales y los vasos linfáticos para el tratamiento del cáncer y el tratamiento o la prevención de la metástasis del cáncer. A pesar de que el sistema mejorado de administración de fármacos puede proporcionar muchas ventajas sobre las formulaciones del estado de la técnica, los medicamentos contra el cáncer adsorbidos en nanopartículas de fosfato de calcio son, o bien quimioterapéuticos o agonistas de la liberación de hormona, lo cual puede tener numerosos efectos secundarios graves, debido a que interfieren con el crecimiento celular normal, así como también con crecimiento de las células cancerosas.

35 Las nanopartículas inorgánicas presentan varias ventajas con respecto a las nanopartículas orgánicas: no son atacadas por cepas microbianas, con frecuencia no son tóxicas, la preparación es fácil y la estabilidad de almacenamiento es normalmente buena. (V. Sokolova, M. Eppe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 1382-1395). En especial las nanopartículas de fosfato de calcio cumplen con todas estas ventajas, porque son biodegradables y biocompatibles (D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, M. Eppe, *Biomaterials* 2004, 47, 3335-3340; C. Schiller, M. Eppe, *Biomaterials* 2003, 24, 2037-2043; D. Tadic, F. Peters, M. Eppe, *Biomaterials* 2002, 23, 2553-2559; S.V. Dorozhkin, M. Eppe, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 3130-3146). Además, son estructural y químicamente muy cercanas a los minerales de los huesos humanos (S. Weiner, H.D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998, 28, 271-298). Otra ventaja de las nanopartículas de fosfato de calcio es la posibilidad de incorporar lantánidos. Estas partículas dopadas con lantánidos muestran fluorescencia, por lo tanto es posible seguir fácilmente su trayecto a través, por ejemplo, de las células (A. Doat, M. Fanjul, F. Pelle, E. Hollande, A. Lebugle, *Biomaterials* 2003, 24, 3365-3371; A. Doat, F. Pelle, N. Gardant, A. Lebugle, *J. Solid State Chem.* 2004, 177, 1179-1187; A. Lebugle, F. Pelle, C. Charvillat, I. Rousselot, J.Y. Chane-Ching, *Chem. Commun.* 2006, 606-608; S. Padilla Mondejar, A. Kovtun, M. Eppe, *J. Mater. Chem.* 2007, 17, 4153-4159; V. Sokolova, A. Kovtun, R. Heumann, M. Eppe, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 174-179).

50 La terapia fotodinámica (TFD) es una técnica prometedora que está siendo estudiada para su uso en una variedad de aplicaciones médicas y que se conoce como un reconocido tratamiento para la destrucción de los tumores (T.D. Mody, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2000, 4, 362-367). La terapia fotodinámica utiliza la luz y un fotosensibilizador (colorante) para lograr el efecto médico deseado. Un gran número de colorantes naturales y sintéticos han sido evaluados como potenciales fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica. Tal vez la clase de fotosensibilizadores más estudiada son los compuestos tetrapirrólicos macrocíclicos. Entre ellas, especialmente las porfirinas y clorinas han sido probados por su eficacia en TFD.

60 Sin embargo, muchas de las formulaciones fotosensibilizadoras no tienen propiedades químicas, farmacológicas y/o foto-físicas para mejorar la biodisponibilidad y por lo tanto la eficacia del fotosensibilizador para lograr un eficaz tratamiento con TFD.

Por ello, se han hecho muchos intentos para mejorar la biodisponibilidad del fotosensibilizador mediante la alteración de su farmacocinética y biodistribución. Proporcionando nanopartículas orgánicas como transportadores de fármacos, la Patente N° US 2004/0047913 A1 por Allemann y otros, describe nanopartículas con fotosensibilizadores comprendiendo porfirinas verdes y nanopartículas seleccionadas de polímeros de poliéster tales como poli (D, L-láctico-co-glicólico) y poli (D, L-láctico). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las nanopartículas orgánicas han demostrado que presentan varias desventajas en comparación con las nanopartículas inorgánicas. Más aún, vehículos biodegradables a base de polímeros portadores de fármacos pueden formar a menudo subproductos de polímeros ácidos o degradarse en fragmentos que pueden modificar el entorno en el que el agente activo se está liberando y pueden afectar negativamente a la droga y/o el tejido con el cual se relacionan.

Otra formulación fotosensibilizadora que comprende nanopartículas luminiscentes con fotosensibilizadores unidos a ellas, para aplicaciones de TFD, es descrito en la patente N° US 2007/0218049 A1 por Chen y otros, Tras la exposición a la radiación ionizante emitida por rayos X, partículas alfa, partículas beta, neutrones y rayos gamma, las nanopartículas luminiscentes emiten luz para activar los fotosensibilizadores, los cuales a su vez producen un efecto letal por TFD en las células cancerosas. Como las nanopartículas luminiscentes necesitan exponerse a una fuente de radiación ionizante, se pierde la importante ventaja de la TFD de una alta selectividad para matar las células tumorales con un daño mínimo al tejido circundante. A pesar de que el efecto letal en las células cancerosas se amplifica por la activación del fotosensibilizador, el tejido sano, como la piel o los órganos que la radiación ionizante debe atravesar a fin de tratar el tumor, es sometido a los efectos peligrosos de la radiación ionizante.

La mayoría de las sustancias empleadas con éxito para la terapia fotodinámica de tumores son sustancias lipofílicas que, debido a su inherente baja solubilidad en agua, deben ser formuladas de una manera adecuada para mejorar su absorción y biodisponibilidad. Por otra parte, sustancias altamente hidrófilas no pueden ser utilizadas para la terapia fotodinámica de tumores, ya que no se acumulan suficientemente en el tejido tumoral.

Otra posible aplicación de la TFD es el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos (M. Wainwright, Photodiagn. Photodyn. Ther., 2005, 2, 263-272). Un problema constante en el tratamiento de las enfermedades infecciosas es la falta de especificidad de los agentes utilizados para el tratamiento de estas enfermedades. En segundo lugar, los microorganismos pueden adaptarse, anulando así el efecto de la mayoría de los antimicrobianos químicamente diseñados, creando cepas resistentes, que requieren ingredientes cada vez más activos para detener su actividad. En este sentido, la TFD ha sido identificada como una alternativa prometedora debido a su mecanismo de acción diferente. Además, sólo hay una muy baja posibilidad de formación de cepas bacterianas resistentes.

El uso de la terapia fotodinámica para el tratamiento de varios tipos de enfermedades ha sido limitado debido a las características inherentes de los fotosensibilizadores (FS). Estas incluyen su alto costo, una retención extendida en el organismo huésped, una foto-toxicidad sustancial en la piel, baja solubilidad en soluciones fisiológicas (lo que también reduce su utilidad para la administración intravascular, ya que puede provocar accidentes tromboembólicos), y una baja efectividad en su selectividad. Estas desventajas, en especial de FS en el estado de la técnica, han llevado a la administración de dosis muy altas de un fotosensibilizador, lo cual aumenta dramáticamente la posibilidad de acumulación del fotosensibilizador en los tejidos no dañados y el consiguiente riesgo de afectar los sitios no dañados.

Los esfuerzos por reducir costos y disminuir la toxicidad de fondo se han estado realizando, pero no están relacionados con los desarrollos de la presente invención. Trabajar para mejorar la solubilidad en soluciones fisiológicas, los efectos de foto-toxicidad en la piel, la retención en el organismo huésped y en menor medida, la eficacia en la selectividad, son las áreas en las que la presente invención proporciona nuevas y no evidentes mejoras en el uso de la TFD para tratar diversas hiperplasias y enfermedades relacionadas, así como para infecciones bacterianas. Más aún, ya que la aplicación de la terapia fotodinámica en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades está aumentando rápidamente, también hay una mayor demanda de nuevas formulaciones fotosensibilizadoras. Estas nuevas formulaciones fotosensibilizadoras necesitan ser estables, fáciles de fabricar y de manejar.

#### Objetivos y Breve Resumen de la Invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método de preparación y formulaciones fotosensibilizadoras basadas en nanopartículas de fosfato de calcio incluyendo estabilizantes para su uso en TFD, especialmente para la terapia fotodinámica de tumores.

Es otro de los objetivos de la presente invención proporcionar un método de preparación y formulaciones fotosensibilizadoras basadas en nanopartículas de fosfato de calcio incluyendo estabilizantes para su uso en TFD antibacteriana.

Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar método de preparación y formulaciones fotosensibilizadoras de fotosensibilizadores hidrófilos basados en nanopartículas de fosfato de calcio sin estabilizantes para su uso en TFD.

Es aún otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de preparación y formulaciones fotosensibilizadoras basadas en nanopartículas de fosfato de calcio para su uso en el diagnóstico, la localización de células, los tejidos o las bacterias, mediante el uso de métodos de imagen de fluorescencia.

5 Brevemente, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas de nanopartículas cargadas con fotosensibilizadores y sus métodos de preparación para la terapia fotodinámica, que comprende un fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo, fosfato de calcio nanoparticulado y en algunos casos reactivos auxiliares, tales como estabilizantes. Las formulaciones de nanopartículas basadas en fosfato de calcio de la presente invención proporcionan  
 10 excelente estabilidad de almacenamiento y cantidades terapéuticamente eficaces de fotosensibilizador para la administración intravenosa o tópica. En una realización preferida, los derivados de tetrapirroles tales como porfirinas, clorinas y bacterioclorinas, son los fotosensibilizadores hidrófobos preferidos que se formulan en las formulaciones de nanopartículas de fosfato de calcio para la terapia fotodinámica de tumores. Además, el *p*TPPP es un fotosensibilizador hidrófilo preferido para la terapia fotodinámica de tumores. En otra realización preferida, se han encontrado  
 15 fotosensibilizadores hidrófilos catiónicos y aniónicos, especialmente las series de fenazinio, fenotiazinio y xantenos, para inactivar las bacterias patógenas y son los fotosensibilizadores preferidos para formularse en las formulaciones de nanopartículas de fosfato de calcio para la terapia fotodinámica antibacteriana. En otra realización, las formulaciones de nanopartículas fotosensibilizadoras son útiles para localizar células, tejidos o bacterias mediante el uso de métodos de imagen por fluorescencia.

20 Los objetivos trazados arriba y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción leída en conjunto con las figuras que la acompañan.

#### Breve Descripción de los Dibujos

25 FIG. 1a-1 muestra un espectro UV de nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP y funcionalizadas con PSS.

FIG. 1a-2 presenta una comparación de los análisis termogravimétricos de partículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS con y sin *m*THPP adsorbida.

30 FIG. 1a-3 muestra difractogramas de rayos X de muestras en polvo de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con PSS con y sin *m*THPP y líneas verticales mostrando los reflejos calculados para la hidroxiapatita.

35 FIG. 1a-4 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con *m*THPP después de la ultracentrifugación.

FIG. 1a-5 presenta los espectros de fluorescencia de nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP y estabilizadas con PSS.

40 FIG. 1a-6 muestra una micrografía SEM de nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP y funcionalizadas con PSS/PAH después de la ultracentrifugación.

45 FIG. 1b-1 muestra los espectros UV de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC y cargadas con *m*THPP.

FIG. 1b-2 presenta análisis termogravimétrico de partículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC con y sin *m*THPP adsorbida.

50 FIG. 1b-3 muestra difractogramas de rayos X de muestras en polvo de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con CMC con y sin *m*THPP y de los reflejos calculados para la hidroxiapatita.

FIG. 1b-4 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC y cargadas con *m*THPP.

55 FIG. 2-1 presenta un espectro UV de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con MB.

FIG. 2-2 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con MB.

60 FIG. 3-1 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con *p*TPPP después de volver a la dispersión.

FIG. 3-2 compara los espectros de emisión de fluorescencia de nanopartículas de fosfato de calcio dispersadas y funcionalizadas con *p*TPPP (concentración eficaz de *p*-TPPP:  $10 \pm 2 \mu\text{M}$ ) y una solución acuosa de *p*TPPP ( $10 \mu\text{M}$ ) a pH 7.4.

FIG. 3-3 muestra el espectro de emisión de fluorescencia de nanopartículas de fosfato de calcio centrifugadas (sólidas) funcionalizadas con *p*TPPP.

5 FIG. 4 muestra resultados representativos de ensayos en células de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con *m*THPP con una concentración de *m*THPP en las partículas de 16.7  $\mu$ M.

10 FIG. 5 muestra la inactivación fotodinámica de suspensiones bacterianas de *Staphylococcus aureus* DSM1104 (ATCC 25923) en PBS (tampón fosfato salino) por una formulación de azul de metileno basada en nanopartículas de fosfato de calcio (30 minutos de incubación antes de la iluminación).

15 FIG. 6 muestra la inactivación fotodinámica de suspensiones bacterianas de *Staphylococcus aureus* DSM1104 (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* DSM1117 (ATCC 27853) en PBS (tampón fosfato salino) por una formulación de *m*THPP basada en nanopartículas de fosfato de calcio (90 minutos de incubación antes de la iluminación).

20 FIG. 7 muestra una comparación del efecto fotodinámico del fotosensibilizador *p*TPPP en su forma pura (solución acuosa) y de una formulación de nanopartículas de fosfato de calcio de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 La terapia fotodinámica ha demostrado ser eficaz sobre las técnicas del estado de la técnica en muchas aplicaciones tales como tratamientos de tumores y terapias antibacterianas. Sin embargo, la eficacia de la TFD depende tanto de la luz y del fotosensibilizador usado. Las formulaciones fotosensibilizadoras del estado de la técnica presentan muchas desventajas tales como la inadecuada solubilidad en soluciones fisiológicas, inadecuada estabilidad de almacenamiento, largo plazo de retención en los tejidos, extendida foto-toxicidad en la piel e ineficacia al seleccionar zonas enfermas.

30 Por lo tanto, hay una mayor demanda de nuevas formulaciones fotosensibilizadoras con mejores propiedades técnicas y físico-químicas que los compuestos del estado de la técnica. La presente invención satisface las necesidades de las formulaciones del estado de la técnica proporcionando una formulación fotosensibilizadora estable y fácil para fabricar y manejar. Por otra parte, la presente invención proporciona formulaciones fotosensibilizadoras con mejor solubilidad en soluciones fisiológicas y eficaces para el tratamiento de la hiperplasia y otras enfermedades relacionadas, así como también para las infecciones bacterianas. Además, ofrece alternativas novedosas para el suministro de fotosensibilizadores tanto hidrófobos como hidrófilos en forma de nanopartículas inorgánicas estabilizadas.

35 En una realización preferida, se proporcionan formulaciones farmacéuticas de nanopartículas cargadas con fotosensibilizadores para aplicaciones de TFD basadas en fosfato de calcio. Comprenden un fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo, fosfato de calcio y un agente estabilizador.

40 Para el tratamiento fotodinámico de tumores, como fotosensibilizadores hidrófilos se prefiere al *p*TPPP pero no se limitan solo a este, mientras que los fotosensibilizadores hidrófobos que son de preferencia son los fotosensibilizadores basados en tetrapirroles pero no se limitan solo a este, y son seleccionados a partir de las porfirinas, clorinas o bacterioclorinas que tienen máximos de absorción de luz en el rango de 640 - 780nm.

45 Para las terapias fotodinámicas antibacterianas, se selecciona el fotosensibilizador preferentemente entre colorantes de fenazinio, fenotiazinio, o xanteno (es decir, azul de toluidina, azul de metileno y sus derivados, safranina y sus derivados, eritrosina y sus derivados).

50 Los estabilizadores preferidos son los polielectrolitos aniónicos poliestireno sulfonado (PSS) y carboximetilcelulosa (CMC) y los polielectrolitos catiónicos polialilamina hidrociorada (PAH) y polietileimina (PEI). Se ha demostrado que las nanopartículas de fosfato de calcio pueden ser estabilizadas por estos polielectrolitos (H. Urch, C. Geismann, M. Ulbricht, M. Epple, *Materialwiss. und Werkstofftech.*, 2006, 37, 422-425). Además, es posible añadir hasta tres capas de polímero de carga alternativa sobre las nanopartículas de fosfato de calcio utilizando la conocida técnica de capa por capa (G. Decher, *Science*, 1997, 277, 1232-1237). Mediante procesos adecuados, el núcleo de fosfato de calcio puede ser disuelto, dejando tras de sí una cápsula de polielectrolito (J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz González, JM González Calbet, M. Vallet Regi, Epple M., 2008, *J. Mater. Chem.*, 18, 3831-3834). La posibilidad de incorporar especies de bajo peso molecular en tales capas de polímero depositadas sobre los núcleos de poliestireno se conoce en la literatura (Z. Dai, A. Voigt, S. Leporatti, E. Donath, L. Dähne, H. Möhwald, *Adv. Mater.* 2001, 13, 1339-1342).

60 En una realización preferida, se proporciona un método de preparación de formulaciones de nanopartículas fotosensibilizadoras basadas en fosfato de calcio. El método incluye los pasos de:

1) la formación de nanopartículas por un proceso de precipitación continua de soluciones de calcio y fosfato;

2) la adición de un agente estabilizador, tal como PSS o CMC, durante la precipitación de las nanopartículas de fosfato de calcio;

3) la adición del fotosensibilizador antes, durante o después de la precipitación; y

5 4) la funcionalización de las partículas de fosfato de calcio estabilizadas, cargadas con el fotosensibilizador, utilizando el método de capa por capa.

10 En el caso de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con PSS el fotosensibilizador se añade a la dispersión poco después de la precipitación. En el caso de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con CMC el fotosensibilizador se añade al componente de fosfato antes de la precipitación. Además, las partículas de fosfato de calcio estabilizadas con PSS y cargadas con fotosensibilizador puede ser aún más funcionalizadas con PAH utilizando el método de capa por capa. Las partículas funcionalizadas con CMC y cargadas con fotosensibilizador pueden ser más funcionalizadas con PEI. Por lo tanto, existe una amplia gama de posibilidades de funcionalización para las dispersiones de nanopartículas que también implica un estricto control de su carga (aniónica o catiónica).

15 En otra realización preferida, se proporciona un método de preparación de formulaciones de nanopartículas fotosensibilizadoras basadas en fosfato de calcio, sin necesidad de añadir un agente estabilizador. El método incluye los pasos de:

20 1) la formación de nanopartículas por un proceso de precipitación continua de soluciones de calcio y fosfato; y

2) la adición del fotosensibilizador antes, durante o después de la precipitación.

25 En el caso de partículas de fosfato de calcio no funcionalizadas el fotosensibilizador se añade directamente a la dispersión de fosfato de calcio.

30 Se trata de una ventaja específica de las formulaciones de la presente invención que a veces el fotosensibilizador se pueda formular con el fosfato de calcio sin necesidad de utilizar un agente de estabilización adicional (Ejemplo 3). Por lo tanto, los métodos descritos en la presente invención permiten la formulación de fotosensibilizadores altamente hidrófilos tales como el  $p$ TPPP. En general, tales fotosensibilizadores altamente hidrófilos no son adecuados para la terapia fotodinámica de tumores debido a su baja solubilidad en agua. Sorprendentemente, se encontró que un fotosensibilizador muy hidrófilo como el  $p$ TPPP cuando se formula en las nanopartículas de fosfato de calcio tal como se describe en la presente invención se convierte en fotodinámicamente activo contra las células tumorales HT29 (Ejemplo 6, que muestra las diferentes actividades de la forma pura de  $p$ TPPP y la formulación de nanopartículas fosfato de calcio cargadas con  $p$ TPPP).

40 Las formulaciones de nanopartículas fotosensibilizadoras son útiles para dirigir la molécula de fotosensibilizador a células, tejidos o células bacterianas no deseadas, o hacia otros objetos no deseados y, después de la irradiación con una fuente de luz apropiada, para dañar el objetivo. Además, en otra realización las formulaciones fotosensibilizadoras también son útiles para localizar células, tejidos o células bacterianas no deseadas u otros objetos no deseados mediante el uso de métodos de imagen de fluorescencia generalmente con longitudes de onda absorbidas por la luz ultravioleta para generar fluorescencia visible (compárese con el Ejemplo 3). La imagen se puede hacer sin o en combinación con la activación fotoquímica del fotosensibilizador, por lo general con irradiaciones de luz visible o en el infrarrojo cercano.

45 El fosfato de calcio constituye el mineral inorgánico de los huesos y los dientes de los mamíferos y por ello, las nanopartículas de fosfato de calcio son bien toleradas por el cuerpo. Por consiguiente, funcionan como transportadores muy eficaces para fármacos con una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Al unirse el fotosensibilizador sobre y dentro de las nanopartículas de fosfato de calcio, los fotosensibilizadores insolubles en agua pueden dispersarse en agua. De esta manera, se puede evitar la aplicación de soluciones alcohólicas.

50 Se presentan los siguientes ejemplos, para proporcionar a los expertos en la materia una completa e ilustrativa divulgación y descripción de cómo hacer las nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con fotosensibilizador de la invención y mostrar su actividad fotodinámica, sin pretender limitar el alcance de lo que el inventor considera la invención. Se hicieron todos los esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ej. cantidades, temperatura, etc.), pero deben considerarse algunos errores experimentales y desviaciones.

60 EJEMPLO 1a - Descripción de la preparación de una formulación que comprende nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con PSS y un fotosensibilizador hidrófobo, 5,10,15,20-tetrakis (3-hidroxifenil)-porfirina ( $m$ THPP)

Las nanopartículas recubiertas de PSS fueron preparadas a temperatura ambiente bombeando rápidamente soluciones acuosas de lactato de calcio (18 mM),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (10,8 mM), y PSS ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) en una proporción de volumen de 1: 1: 2 en un recipiente agitado que contiene 4 partes de volumen de agua. El PSS funcionaliza y estabiliza las nanopartículas de fosfato de calcio emergentes (H. Urch, C. Geismann, M. Ulbricht, M. Epple, Materialwiss. und Werkstofftech, 2006,

37, 422-425). El pH de las soluciones de calcio y fosfato se ajustó previamente a 10 con una solución de amoníaco. Después de un minuto, se añadió *m*THPP (1,5 mM de 2-propanol) en una proporción de volumen de 1: 5 a 1: 1 con respecto al volumen de la solución de fosfato. El pH final de la dispersión coloidal fue de 9,3 a 9,5. Después de 4 días, las partículas se separaron de los contra-iones (lactato,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), de un exceso de PSS (disuelto) y de *m*THPP no adsorbidos por ultracentrifugación a 66.000 g durante 30 minutos. Las nanopartículas centrifugadas se redispersaron en agua, se centrifugaron y se redispersaron de nuevo. Se utilizó agua ultrapura (PURELAB Ultra de ELGA) para todas las preparaciones.

Los productos se caracterizaron por varios métodos analíticos. El análisis termogravimétrico (TG) se llevó a cabo con un instrumento Netzsch STA PC 409 (atmósfera de oxígeno dinámica de  $50 \text{ ml min}^{-1}$ ; velocidad de calentamiento de  $1 \text{ K min}^{-1}$ , crisol de alúmina abierto). Difracción de rayos X en muestras de polvo (XDR; difractómetro Siemens D500; radiación de  $\text{Cu K}\alpha$ ,  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ), y microscopía electrónica de barrido junto con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDX; ESEM Quanta FEG 400, FEI; oro-paladio [80: 20]- muestras bombardeadas; detector EDX: S-UTW-Si(Li)). Se realizaron dispersión de luz dinámica (DLS) y determinaciones de potencial zeta con un instrumento Zetasizer nanoseries (Malvern Nano-ZS, láser:  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ). Los espectros de emisión y de excitación fueron medidos a temperatura ambiente usando un espectrofluorómetro J&M (Analytische Mess- und Regeltechnik FL3095-500) equipado con un policromador de matriz de diodos y una lámpara de xenón de 75 W. Los espectros de emisión se corrigieron para la sensibilidad del detector y los espectros de excitación para la intensidad de la luz de excitación. Los espectros de absorción UV-visible se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary WinUV en cubetas de cuarzo de 1 cm.

La cantidad de *m*THPP absorbido por las partículas se determinó por espectroscopía UV mediante el registro de una curva de calibración. La FIG. 1a-1 muestra el espectro de absorción típico del coloide de fosfato de calcio cargado con *m*THPP. Este espectro de absorción es similar al del espectro de absorción de *m*THPP disuelto.

La FIG. 1a-2 muestra el análisis termogravimétrico de las nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS, con o sin *m*THPP adsorbido. La primera pérdida de peso corresponde a la pérdida de agua de los compuestos que es muy similar para ambos tipos de muestras. La segunda pérdida de peso muestra la combustión de la parte polimérica; en este caso la cantidad de polímero difiere en un 3,5%. Aparentemente, el *m*THPP inhibe la absorción de PSS hasta un cierto punto. La tercera pérdida de peso del 2,9% de las nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP corresponde a la combustión de *m*THPP que falta para las partículas no cargadas. Esta cantidad de *m*THPP está de acuerdo con los resultados obtenidos de la espectroscopía UV cuantitativa. La última pérdida de peso muestra la pérdida de dióxido de carbono debido al contenido de carbonato de la fase mineral. Estos resultados también fueron confirmados por análisis elemental (C, H, N, Ca,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). La proporción de calcio y fosfato es de 1,67, es decir, la proporción estequiométrica de la hidroxiapatita.

La FIG. 1a-3 muestra los difractogramas de rayos X de muestras de polvo de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con PSS, con y sin *m*THPP adsorbido. Las partículas consisten de hidroxiapatita nanocristalina,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ , según lo indicado por los anchos picos de difracción.

La FIG. 1a-4 muestra una imagen SEM de las nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con *m*THPP. Las partículas son aproximadamente de 80 a 100nm de diámetro, con una distribución de tamaño más bien monodispersa.

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz confirmaron estos resultados. El potencial zeta de las partículas es de aproximadamente -20 mV. A pesar del potencial zeta relativamente bajo, las partículas son estables en la dispersión por varias semanas.

Además, fue posible depositar otra capa de polímero en las partículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con *m*THPP mediante la técnica de capa por capa (G. Decher, Science, 1997, 277, 1232-1237; J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J.M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Epple, J. Mater. Chem., 2008, 18, 3831-3834).

El polielectrolito catiónico, PAH ( $4 \text{ g l}^{-1}$ , pH 7) se añadió a la dispersión de partículas en una relación de volumen de 1: 1. Las partículas se separaron del exceso de PAH por ultracentrifugación a 66.000 g durante 30 minutos. Las nanopartículas centrifugadas se redispersaron en agua ultrapura. Los espectros UV fueron similares a los que no tenían una segunda capa polimérica. Medidas de fluorescencia muestran una disminución en la intensidad de fluorescencia con la deposición de la capa PAH (FIG. 1a-5).

Las medidas de dispersión dinámica de la luz mostraron un ligero aumento del diámetro de las partículas. Esto fue confirmado por SEM (FIG. 1a-6). El diámetro de las partículas es de 100 -120nm. El potencial zeta es de aproximadamente +50 mV lo que confirma la adsorción del polielectrolito catiónico PAH.

EJEMPLO 1b - Descripción de la preparación de una formulación que comprende nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con CMC y un fotosensibilizador hidrófobo, 5,10,15,20-tetrakis (3-hidroxifenil)-porfirina (*m*THPP)

Las nanopartículas de fosfato de calcio recubiertas de CMC fueron preparadas a temperatura ambiente bombeando rápidamente soluciones acuosas de lactato de calcio (18 mM),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (10,8 mM) y CMC ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) en una proporción de volumen de 1: 1: 1, en un recipiente agitado que contiene 4 partes de volumen de agua. Antes de la precipitación, el fotosensibilizador *m*THPP (1,5 mM en 2-propanol) se mezcló con el componente de fosfato en una proporción de volumen de 20: 1 a 5: 1 en relación con el volumen de la solución de fosfato. El CMC funcionalizó y estabilizó las nanopartículas de fosfato de calcio emergentes. El pH de las soluciones de calcio y fosfato se ajustaron previamente a 10 con una solución de amoníaco. El pH final de la dispersión coloidal fue de 9,2 a 9,5. Las partículas fueron separadas de los contra-iones (lactato,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), del exceso de CMC disuelto y del *m*THPP no absorbido por ultracentrifugación a 66.000 g durante 30 minutos. Las nanopartículas centrifugadas se redispersaron en agua, se centrifugaron y se dispersaron de nuevo. Se utilizó agua ultrapura (PURELAB Ultra de ELGA) para todas las preparaciones. Para lograr la estabilidad de este sistema coloidal, la dispersión tenía que ser diluida en una proporción en volumen de 1: 5 con el agua.

Los productos se caracterizaron por varios métodos analíticos. El análisis termogravimétrico (TG) se llevó a cabo con un instrumento Netzsch STA PC 409 (atmósfera dinámica de oxígeno de  $50 \text{ ml min}^{-1}$ ; velocidad de calentamiento de  $1 \text{ K min}^{-1}$ , crisol de alúmina abierto). Difracción de rayos X en muestras de polvo (XRD; difractómetro Siemens D500; radiación Cu K $\alpha$ ,  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), y microscopía electrónica de barrido junto con espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDX, ESEM Quanta FEG 400, FEI, oro-paladio [80: 20]- muestras bombardeadas; detector EDX: S-UTW-Si (Li)).

Se realizaron dispersión de luz dinámica (DLS) y determinaciones de potencial zeta con un instrumento Zetasizer nanoserie (Malvern Nano-ZS, láser:  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ). Los espectros de emisión y de excitación fueron medidos a temperatura ambiente usando un espectrofluorómetro J&M (Analytische Mess- und Regeltechnik FL3095-500) equipado con un policromador de matriz de diodos y una lámpara de xenón de 75 W. Los espectros de emisión se corrigieron para la sensibilidad del detector y los espectros de excitación para la intensidad de la luz de excitación. Los espectros de absorción UV-visible se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary WinUV en cubetas de cuarzo de 1 cm.

La cantidad de *m*THPP absorbido por las partículas se midió mediante espectroscopía UV. La FIG. 1b-1 muestra la absorción típica del coloide de fosfato de calcio cargado con *m*THPP. Excepto por los picos más anchos, el espectro de absorción es parecido al espectro de absorción del *m*THPP libre.

La FIG. 1b-2 muestra los resultados de los análisis termogravimétricos de las nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC, con o sin *m*THPP adsorbido. La primera pérdida de peso corresponde a la pérdida de agua de los compuestos. Esta es 4,5% mayor para las partículas cargadas con *m*THPP que para las partículas no cargadas. La segunda pérdida de peso es debido a la combustión del polímero, en este caso las cantidades difieren en 3,3%. Aparentemente, en este caso, el *m*THPP promueve la adsorción del CMC hasta cierto punto. La tercera pérdida de peso del 2,6% de las nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP se debe a la combustión del *m*THPP. La última pérdida de peso muestra la pérdida de dióxido de carbono debido al contenido de carbonato de la fase mineral. Estos resultados son confirmados por análisis elemental. La proporción de calcio y fosfato es de 1,76, que es un poco más alta que la proporción estequiométrica de hidroxiapatita (1,67).

La FIG. 3-1b muestra los difractogramas de rayos X de muestras en polvo de nanopartículas de fosfato de calcio estabilizadas con CMC, con y sin *m*THPP adsorbido. Las partículas son amorfas para los rayos X, es decir, no se distinguen picos definidos. Las líneas verticales muestran las posiciones calculadas para los picos de hidroxiapatita,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ .

La FIG. 1b-4 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC y cargadas con *m*THPP. Las partículas son de aproximadamente 80-100nm de diámetro, con una distribución de tamaño más bien monodispersa. Las medidas de dispersión dinámica de la luz confirmaron estos resultados. El potencial zeta de las partículas es de aproximadamente -20 mV. A pesar del bajo potencial zeta, las partículas son estables en dispersión por varias semanas.

Además, se puede depositar otra capa de polímero en las partículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC y cargadas con *m*THPP mediante la técnica de capa por capa (G. Decher, Science, 1997, 277, 1232-1237; J. Schwiertz, W. Meyer-Zaika, L. Ruiz-Gonzalez, J.M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Epple, J. Mater. Chem., 2008, 18, 3831-3834).

El polielectrolito catiónico PEI ( $2 \text{ g l}^{-1}$ , pH 10,4) se añadió a la dispersión de partículas en una relación de volumen de 8: 1. Las partículas se separaron del exceso de PEI por ultracentrifugación a 66.000 g durante 30 minutos. Las nanopartículas centrifugadas se redispersaron en agua ultrapura. El tamaño de las partículas aumentó a 40nm y el potencial zeta fue +30 mV lo que confirma la adsorción de los polielectrolitos positivos PEI. Las partículas son estables en la dispersión por unas pocas semanas.

En conclusión, fue posible preparar nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con *m*THPP y funcionalizadas en forma diferente. Todos los sistemas coloidales se mantuvieron estables durante varias semanas. Las distribuciones de tamaño de todas las muestras estuvieron por debajo del índice de polidispersidad (PDI) de 0.3, lo que ilustra la fiabilidad de las medidas de dispersión dinámica de luz. Las imágenes SEM confirman una distribución de tamaño angosta. La cantidad de *m*THPP adsorbido por las nanopartículas de fosfato de calcio se midió mediante espectroscopía UV y análisis termogravimétrico. La estructura interna de las partículas varía de amorfa a hidroxiapatita nanocrystalina.

EJEMPLO 2 - Descripción de la preparación de una formulación que comprende nanopartículas de fosfato de calcio y el fotosensibilizador hidrófilo azul de metileno (MB)

Las nanopartículas recubiertas de PSS fueron preparadas a temperatura ambiente bombeando rápidamente soluciones acuosas de lactato de calcio (18 mM),  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (10,8 mM), y PSS ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) en una proporción de volumen de 1: 1: 2 en un recipiente agitado que contiene 4 partes de volumen de agua. El PSS funcionalizó y estabilizó las nanopartículas de fosfato de calcio que se formaban. El pH de las soluciones de calcio y fosfato se ajustó previamente a 10 con solución de hidróxido de potasio. Después de un minuto se añadió MB (0,003 M) en una proporción de volumen de 1: 1 con respecto a la solución de fosfato.

Las partículas fueron separadas de los contra-iones (lactato,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), del exceso de PSS disuelto y del MB no adsorbido, por ultracentrifugación a 150.000 g durante 30 minutos. Las nanopartículas centrifugadas se redispersaron en agua, se centrifugaron y se redispersaron de nuevo. Se utilizó agua ultrapura (PURELAB Ultra de ELGA) para todas las preparaciones.

Los productos se caracterizaron por varios métodos analíticos. El análisis termogravimétrico (TG) se llevó a cabo con un instrumento Netzsch STA PC 409 (atmósfera dinámica de oxígeno de  $50 \text{ ml min}^{-1}$ ; velocidad de calentamiento de  $1 \text{ K min}^{-1}$ , crisol de alúmina abierto). Difracción de rayos X en polvo (XDR, difractómetro Siemens D500; radiación Cu  $\text{K}\alpha$ ,  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), y microscopía electrónica de barrido junto con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva de (SEM-EDX, ESEM Quanta FEG 400, FEI, oro-paladio [80: 20]- muestras bombardeadas; detector EDX: S-UTW-Si (Li)). Dispersión de luz dinámica (DLS) y determinaciones de potencial zeta con un instrumento Zetasizer nanoserie (Malvern Nano-ZS, láser:  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ). Los espectros de emisión y de excitación fueron medidos a temperatura ambiente usando un espectrofluorómetro J&M (Analytische Mess- und Regeltechnik FL3095-500) equipado con un policromador de matriz de diodos y una lámpara de xenón de 75 W. Los espectros de emisión se corrigieron para la sensibilidad del detector y los espectros de excitación para la intensidad de la luz de excitación. Los espectros de absorción UV-visible se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary WinUV en cubetas de cuarzo de 1 cm.

La cantidad de MB absorbido por las partículas se midió mediante espectroscopia UV. La FIG. 2-1 muestra la absorción típica del coloide de fosfato de calcio cargado con MB. Este patrón de absorción es similar al patrón de absorción del MB libre.

La FIG. 2-2 muestra una imagen SEM de nanopartículas de fosfato de calcio funcionalizadas con PSS y cargadas con MB. Las partículas son de aproximadamente 50 – 80 nm de diámetro, con una distribución de tamaño más bien monodispersa. El potencial zeta de estas partículas es de aproximadamente -20 mV. A pesar del bajo potencial zeta, las partículas son estables en dispersión por varias semanas.

En conclusión, fue posible preparar nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con MB y funcionalizadas con PSS. Estas partículas fueron estables por varias semanas. Las distribuciones de tamaño de todas las muestras estuvieron por debajo del índice de polidispersidad (PDI) de 0.3, lo que ilustra la fiabilidad de las medidas de dispersión dinámica de luz. Las imágenes SEM confirman una distribución de tamaño angosta. La cantidad de MB adsorbido por las nanopartículas de fosfato de calcio se confirmó mediante espectroscopia UV.

EJEMPLO 3 - Descripción de la preparación de una formulación que comprende nanopartículas de fosfato de calcio y un fotosensibilizador hidrófilo funcionalizado con fosfato (pTPPP)

Se prepararon nanopartículas de fosfato de calcio bombeando soluciones acuosas de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (3 mM) y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (1,8 mM) en un recipiente con agitación (T. Welzel, I. Radtke, W. Meyer-Zaika, R. Heumann y M. Epple, J. Mater. Chem., 2004, 14, 2213-2217). El pH de las soluciones de calcio y fosfato se ajustó previamente a 9 con 0,1 N de NaOH acuoso. Unos segundos después de mezclarla, la dispersión de nanopartículas fue tomada con una jeringa. Los coloides fueron preparados mezclando rápidamente una solución acuosa de la sal sódica del pTPPP (30  $\mu\text{M}$ ) con las nanopartículas dispersas de fosfato de calcio en una relación de 5 ml: 10 ml. El pH final de la dispersión coloidal fue de entre 7,5 y 8,5. Los coloides fueron almacenados a 4 a 8 °C, excluyéndolos de la luz. Las partículas fueron separadas de los contra-iones ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) y del pTPPP no adsorbido por ultracentrifugación a 371.000 g. Las nanopartículas centrifugadas se lavaron con 100 ml de etanol absoluto, se redispersaron en agua y se secaron al aire. Se utilizó agua ultrapura (PURELAB Ultra de ELGA) para todas las preparaciones.

La cantidad de *p*TPPP disuelta en el sobrenadante después de la ultracentrifugación fue de alrededor de 30%, según lo determinado por espectroscopia UV, es decir, alrededor del 70% del importe total de la *p*TPPP se adsorbió sobre la superficie de fosfato de calcio. El contenido de *p*TPPP en las nanopartículas se calculó de la siguiente manera, tomando la cantidad de porfirina, calcio y fosfato en la síntesis: si asumimos que todo el calcio y el fosfato se precipitan de la solución como hidroxiapatita, es decir,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , el contenido máximo de *p*TPPP en la fase sólida es de aproximadamente 0,7 x 5,5% en peso = 3,9% en peso. El análisis elemental de las nanopartículas dopadas con *p*TPPP por análisis elemental de combustión dio 2,32 en peso% de C y 2,73% en peso de H. Como el hidrógeno también puede provenir de grupos de hidróxido y de agua absorbida, solamente se utilizó el contenido de carbono, que dio una carga de 5,2% en peso de *p*TPPP en el sólido. Llegamos a la conclusión de que la carga de *p*TPPP en el sólido es de alrededor de 4 a 5% en peso. Atribuimos la diferencia entre los dos métodos a la incertidumbre experimental.

El colorante adsorbido *p*TPPP y las nanopartículas funcionalizadas se caracterizaron por espectroscopia de RMN (Bruker 300 MHz), espectrometría ESI-MS (Bruker BioTOF III equipado con un cañón de ionización electrospray), difracción de rayos X en muestras de polvo (XRD; Siemens D500 diffractometer; Cu  $K\alpha$  radiation,  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ), espectrometría infrarroja de la transformada de Fourier (instrumento FTIR, Bruker-Vortex 70), y microscopía electrónica de barrido junto con espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDX, ESEM Quanta 400 FEG, FEI, oro-paladio [80: 20]-muestras bombardeadas; EDX detector: S-UTW-Si (Li)). Se realizaron determinaciones de dispersión de luz dinámica (DLS) y determinaciones de potencial zeta con un instrumento Zetasizer nanoseries (Malvern Nano-ZS, láser:  $\lambda = 532\text{nm}$ ). Los espectros de emisión y de excitación fueron medidos a temperatura ambiente usando un espectrofluorómetro J&M (Analytische Mess- und Regeltechnik FL3095-500) equipado con un policromador de matriz de diodos y una lámpara de xenón de 75 W. Los espectros de emisión se corrigieron para la sensibilidad del detector y los espectros de excitación para la intensidad de la luz de excitación. Los espectros de absorción UV-visible se registraron con un espectrofotómetro Varian Cary WinUV en cubetas de cuarzo de 1 cm.

La microscopía electrónica de barrido muestra nanopartículas aproximadamente esféricas (**FIG. 3-1**). A una longitud de onda de excitación de 410nm, el espectro de emisión de la dispersión coloidal consiste en una banda intensa en 653nm con un hombro a 705nm (FIG. 3-2). A pH 7,4, la forma parcialmente protonada de *p*TPPP muestra dos bandas intensas a 650nm y 712nm en el espectro de emisión. Este espectro se comparó con el espectro de emisión de las nanopartículas dispersas. En el caso de las nanopartículas dispersas, se observó un hombro ancho a 705nm en lugar de un pico intenso a 712nm. Los cambios espectrales observados en el espectro de absorción y emisión de las nanopartículas dispersas son probablemente causados por la interacción electrostática del *p*TPPP con la superficie de fosfato de calcio. También se midió el espectro de emisión de las nanopartículas de fosfato de calcio centrifugadas (libre de solventes, es decir, sólidas) funcionalizadas con *p*TPPP. Las partículas fueron excitadas en la región del ultravioleta cercano a 306nm (FIG. 3-3). El espectro de emisión mostró dos picos intensos a 472nm y 597nm, concordando bien con el de la porfirina sólida.

Como se desprende de las FIGs. 3-2 y 3-3, las nanopartículas cargadas con *p*TPPP muestran una señal de fluorescencia que se puede utilizar para su detección *in vivo*.

**EJEMPLO 4 – Ensayo en células de la formulación del EJEMPLO 1 (con el fotosensibilizador *m*THPP) en una línea celular tumoral HT29.**

La prueba en células se realizó según el siguiente procedimiento:

La actividad fotosensibilizante se determinó en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT29.

Las líneas celulares HT29 se cultivaron en DMEM (cc-pro GmbH) suplementado con suero fetal de ternero inactivado por calor al 10% (FCS, cc-pro GmbH), penicilina al 1% (10000 UI) y estreptomycin (10.000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , cc-pro GmbH). Las células se mantuvieron como un cultivo en monocapa en una incubadora humidificada (5% de  $\text{CO}_2$  en aire, a 37°C).

Una solución de reserva de la formulación de nanopartículas se mantuvo en la oscuridad a 4 °C. Se llevó a cabo más dilución en medio RPM1 1640 sin rojo de fenol suplementado con FCS al 10% para alcanzar una concentración final de fotosensibilizador de 2 o 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Se sembraron  $2 \cdot 10^4$  células por  $\text{ml}^{-1}$  en microplacas ( $2 \cdot 10^5$  células por pocillo). Las células fueron incubadas con medio fresco (RPMI sin rojo de fenol) conteniendo FCS al 10% con 2 o 10  $\mu\text{M}$  del fotosensibilizador durante 24 h antes de su exposición a la luz. Antes de la fotosensibilización, las células se lavaron, se incubaron con medio RPMI sin rojo de fenol y FCS al 10%, luego se irradiaron a temperatura ambiente con un láser de diodo de 652nm (Ceralas PDT 652, biolitec AG) a una tasa de fluencia fija de 100  $\text{mW.cm}^{-2}$  (50  $\text{J.cm}^{-2}$ ). Después de la irradiación, las células se incubaron en una incubadora humidificada (5% de  $\text{CO}_2$  en aire, a 37°C) durante 24 hs hasta el ensayo de viabilidad celular.

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de XTT. Se disuelven 500 mg de XTT (3-[1-(fenil-amino-carbonil)-3,4-tetrazolil]-bis-[(4-metoxi-6-nitro)-benceno]sulfonato-sódico, Applichem GmbH) en 500 ml de tampón PBS (sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y filtrada estéril. La solución se almacena en la oscuridad a -20 °C hasta su uso. Era necesaria una solución estéril conteniendo PMS (N-metil dibenzopirazina, metil-sulfato, Applichem GmbH) como reactivo de activación para la XTT. Se

disolvió 0,383 mg de PMS en 1 ml de tampón PBS. La solución debe almacenarse congelada y no debe ser expuesta a la luz. La solución del reactivo XTT se descongeló en un baño de agua a 37°C y la solución de activación (PMS) se añadió inmediatamente antes de ser utilizada. Para preparar una solución de reacción suficiente para una microplaca (96 pocillos), se le dio 0,1 ml de solución de activación (PMS) a 5 ml de reactivo XTT. El medio en la microplaca fue intercambiado con RPMI fresco sin rojo de fenol y FCS al 10% (100 µl), antes de la adición de 50 µl de solución de reacción XTT por pocillo. La microplaca se incubó durante 2 - 3 horas a 37°C bajo un 5% de CO<sub>2</sub> hasta que se formó un tinte de color naranja. La microplaca se agitó suavemente para distribuir uniformemente el colorante en los pocillos.

La absorbancia de las muestras se midió con un espectrofotómetro (Tecan Infinito 200, Tecan Grupo Ltd.) a una longitud de onda de 490nm. Con el fin de medir la absorbancia de referencia (para medir lecturas no-específicas) se utilizó una longitud de onda de 630-690nm.

EJEMPLO 5 – Ensayo en células de la formulación del EJEMPLO 2 (con el fotosensibilizador MB) en un cultivo celular bacteriano

El ensayo se realizó según el siguiente procedimiento:

Las cepas bacterianas utilizadas en nuestros estudios fueron la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* DSM1104 (ATCC 25923) y la *Pseudomonas aeruginosa* DSM1117 (ATCC 27853). Las células de estas cepas se cultivaron aeróbicamente durante la noche a 37°C en Caldo de Soja Tríptico (TSB, Merck KGaA de Darmstadt, Alemania). Las células fueron cosechadas por centrifugación y se resuspendieron en tampón fosfato salino estéril (PBS). La DO (densidad óptica) final a 600nm, en un camino de 1cm de longitud, fue de 0,015. Se colocaron alícuotas (190 µl) de las suspensiones bacterianas en placas negras estériles de 96 pocillos con fondo claro (Costar® 3603, Corning Inc., EE.UU.). Se añadió 10 µl de una formulación de azul de metileno basada en nanopartículas de fosfato de calcio. Las placas se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de la incubación se expusieron las muestras a la luz de un láser de diodo de 665nm (Ceralas TFD, biolitec AG, Alemania), ajustando la potencia a 0,55 W, con tiempo de irradiación de 100 s mediante una fibra óptica desde la parte inferior de la placa. La tasa de fluencia con estos ajustes fue de aproximadamente 1 W.cm<sup>-2</sup> (medido con un Optómetro P-9710, Gigahertz-Optik GmbH, Puchheim, Alemania). Con este tiempo de irradiación, el flujo de energía resultante fue de aproximadamente 100 J.cm<sup>-2</sup>. Un pocillo control contenía 10 µl de PBS en lugar de la formulación de azul de metileno y no fue expuesto a la luz láser. La muestra control para la toxicidad en la oscuridad contenía la formulación de azul de metileno, pero no fue expuesta a la luz láser. Después de la iluminación, se extrajeron las muestras de los pocillos de la placa, se diluyeron con Caldo de Soja Tríptico y se sembraron utilizando el Plater Eddy Jet para siembras en espiral (IUL Instruments, Barcelona, España) en placas de agar con soja tríptico. El número de unidades formadoras de colonias (UFC ml<sup>-1</sup>) se enumeraron después de una incubación adecuada mediante el uso del contador de colonias Counterstat Flash (IUL Instruments, Barcelona, España).

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 5. Se encontró un efecto letal de aproximadamente 90% por tratamiento con TFD.

EJEMPLO 6 – Ensayo en células de la formulación del EJEMPLO 1b (con el fotosensibilizador mTHPP) en un cultivo de células bacterianas

Para este ensayo, se utilizaron las partículas de fosfato de calcio funcionalizadas con CMC/PEI.

El ensayo se realizó de acuerdo con el procedimiento dado en el EJEMPLO 5 excepto que el tiempo de incubación fue de 30 min y 90 min, respectivamente.

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 6. Se encontró un efecto letal de aproximadamente 98 a 100% por el tratamiento con TFD contra ambas cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas.

EJEMPLO 7 – Ensayo en células de la formulación del EJEMPLO 3 (con el fotosensibilizador pTPPP) y del fotosensibilizador puro pTPPP en una línea celular tumoral HT29

El ensayo se realizó de acuerdo con el procedimiento dado en el EJEMPLO 4. Se ajustó la concentración de la solución del fotosensibilizador puro como para igualar la cantidad contenida en las nanopartículas.

Como es obvio de la FIG. 7, el fotosensibilizador pTPPP no presenta actividad fotodinámica si se aplica al cultivo de células HT29 en solución acuosa. Si, por el contrario, el fotosensibilizador se aplica en una formulación de nanopartículas de fosfato de calcio, éste exhibe una fototoxicidad muy fuerte a una concentración de 10 µM.

**REIVINDICACIONES**

1. Formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica que comprende:

- 5 • un núcleo cerámico biodegradable cristalino o amorfo con un diámetro en el rango de 5 – 1000nm; más específicamente en el rango de 50 – 250nm;
- una cantidad terapéuticamente eficaz de fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo;
- 10 • un agente estabilizante;

donde dicho núcleo cerámico es sólido o hueco y el material de dicho núcleo es seleccionado del grupo que consiste en fosfato de calcio o carbonato de calcio donde el  $Ca^{2+}$  también puede ser sustituido (parcial o completamente) por otros iones, por ej.  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , o  $Sr^{2+}$ ;

15 donde dicho fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo es seleccionado del grupo que consiste en derivados de tetrapirroles (a saber porfirinas, clorinas, y bacterioclorinas), colorantes fenazinio y fenotiazinio (a saber, azul de toluidina, azul de metileno, safranina), y colorantes de xanteno (a saber eritrosina);

20 y donde dichos agente estabilizante es seleccionado del grupo de polímeros catiónicos, no-iónicos, o aniónicos (a saber poliestireno sulfonado (PSS), carboximetilcelulosa (CMC), polialilamina hidrociorada (PAH), polietilenimina (PEI).

2. Una formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica según la reivindicación 1 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo;

25 donde dicho fotosensibilizador hidrófobo o hidrófilo es un derivado tetrapirrol funcionalizado con grupos fosfato, típicamente de 1 a 4 por molécula.

3. Una formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica según la reivindicación 1 donde la concentración terapéuticamente eficaz del fotosensibilizador es de 1 a 500  $\mu M$ .

4. Una formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica según la reivindicación 3 donde la concentración terapéuticamente eficaz del fotosensibilizador es de 1 a 100  $\mu M$ .

35 5. Una formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica según la reivindicación 1 donde dicho fotosensibilizador es seleccionado del grupo que consiste en temoporfina, azul de metileno, azul de toluidina, safranina y eritrosina.

40 6. Una formulación de nanopartículas farmacéutica para uso en terapia fotodinámica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde dichas nanopartículas están equipadas con un ligando, especialmente un anticuerpo, y fragmento de anticuerpo o un péptido RGD.

7. Una formulación de nanopartículas farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en terapia fotodinámica tumoral.

45 8. Una formulación de nanopartículas farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en terapia fotodinámica antibacteriana.

9. Una formulación de nanopartículas farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento fotodinámico de artritis y enfermedades inflamatorias similares.

50 10. Una formulación de nanopartículas farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en el tratamiento fotodinámico de enfermedades periodontales.

55 11. Una formulación de nanopartículas para uso en terapia fotodinámica según la reivindicación 1 o 2 donde una molécula orientada biológicamente está adjuntada a la superficie de la nanopartícula.

Figura 1a-1

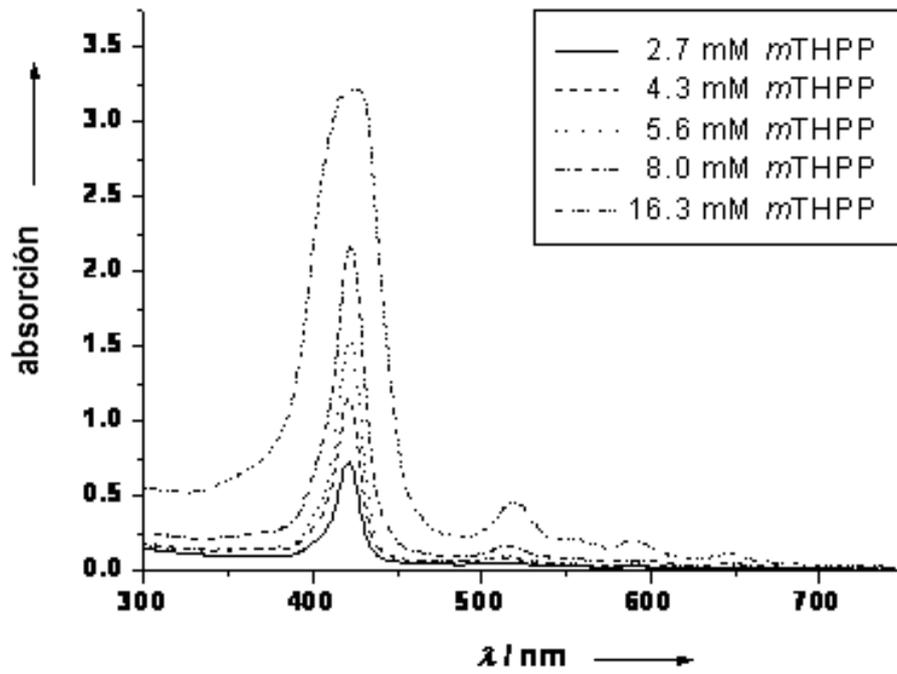


Figura 1a-2

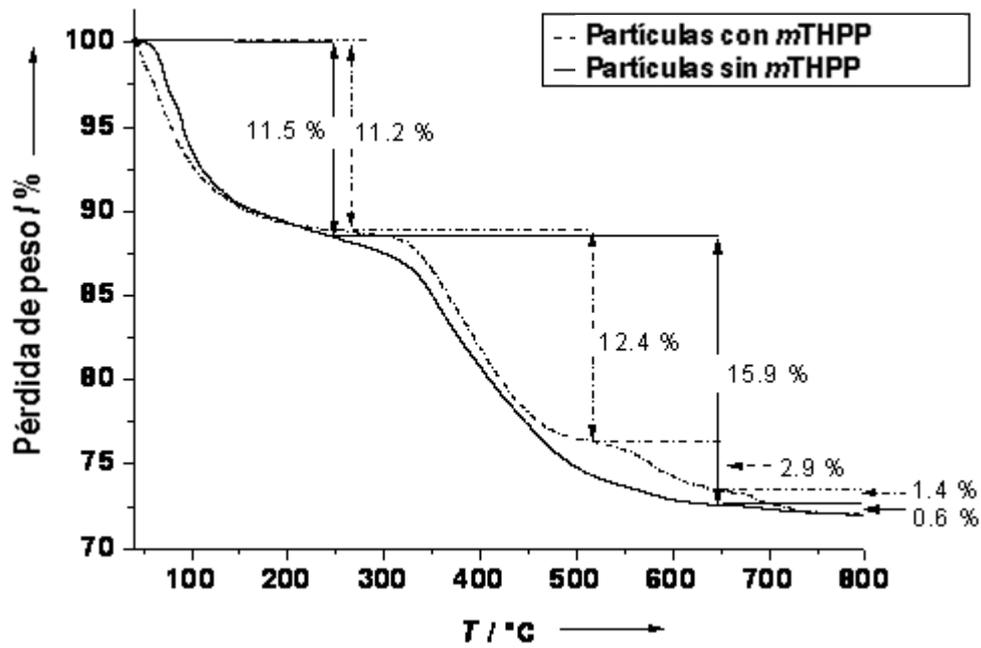


Figura 1a-3

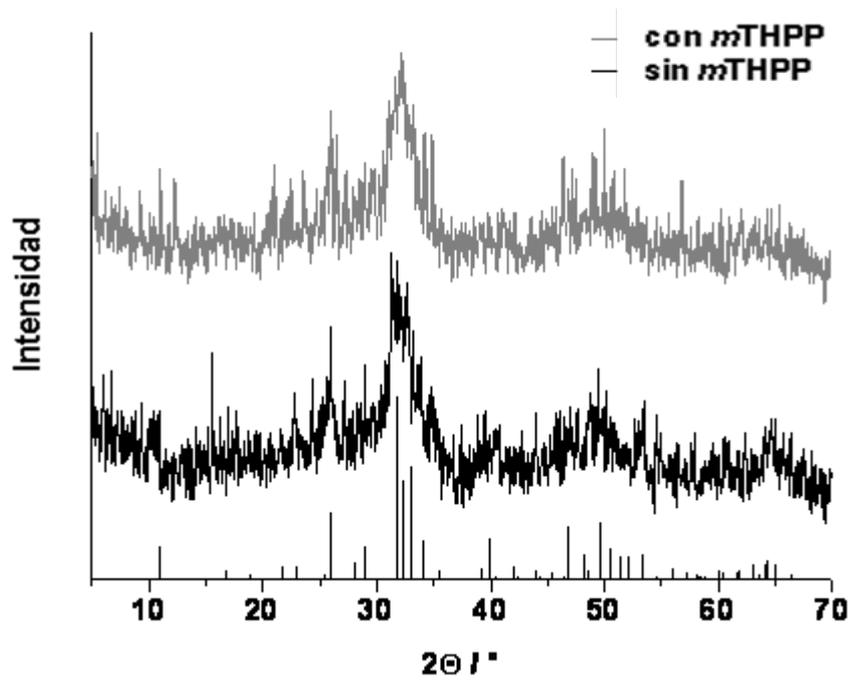


Figura 1a-4

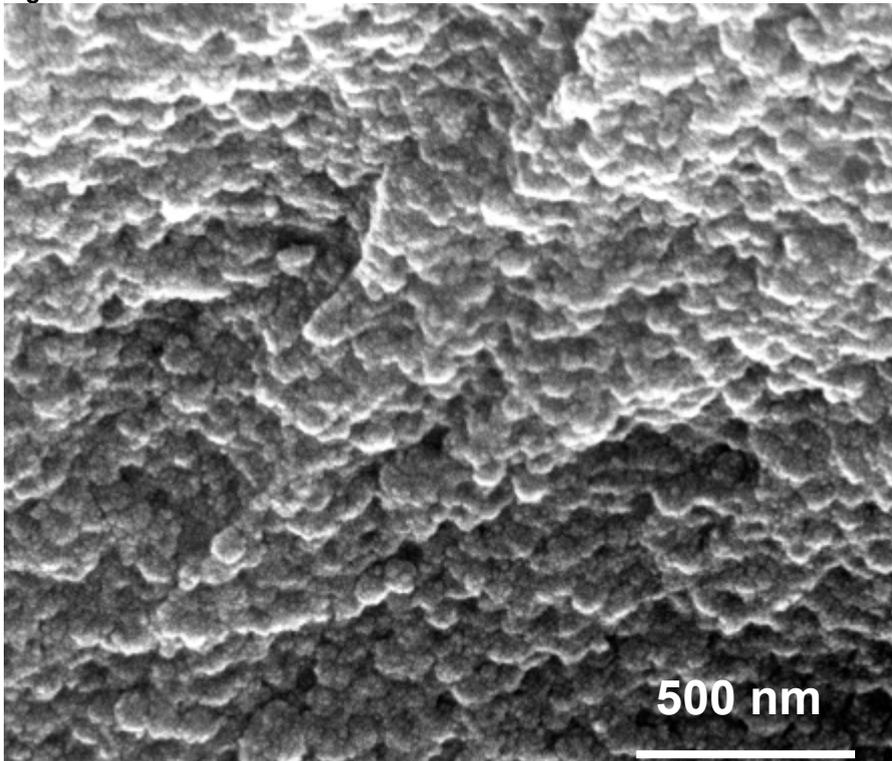


Figura 1a-5

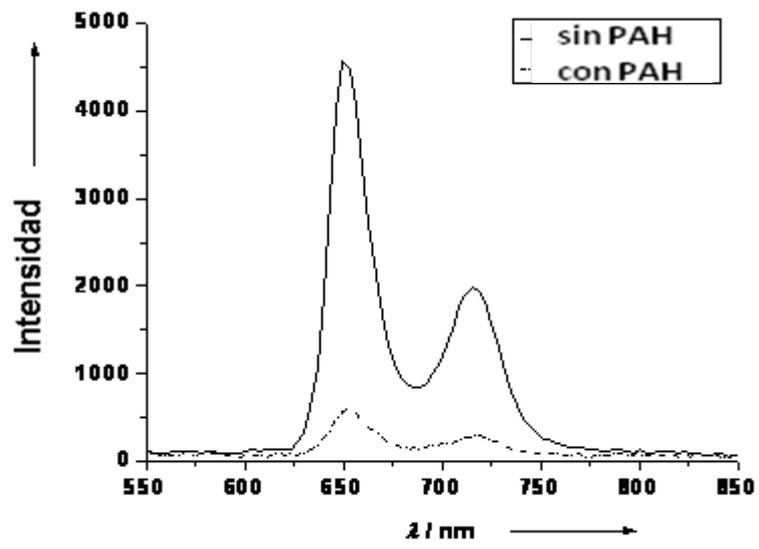


Figura 1a-6

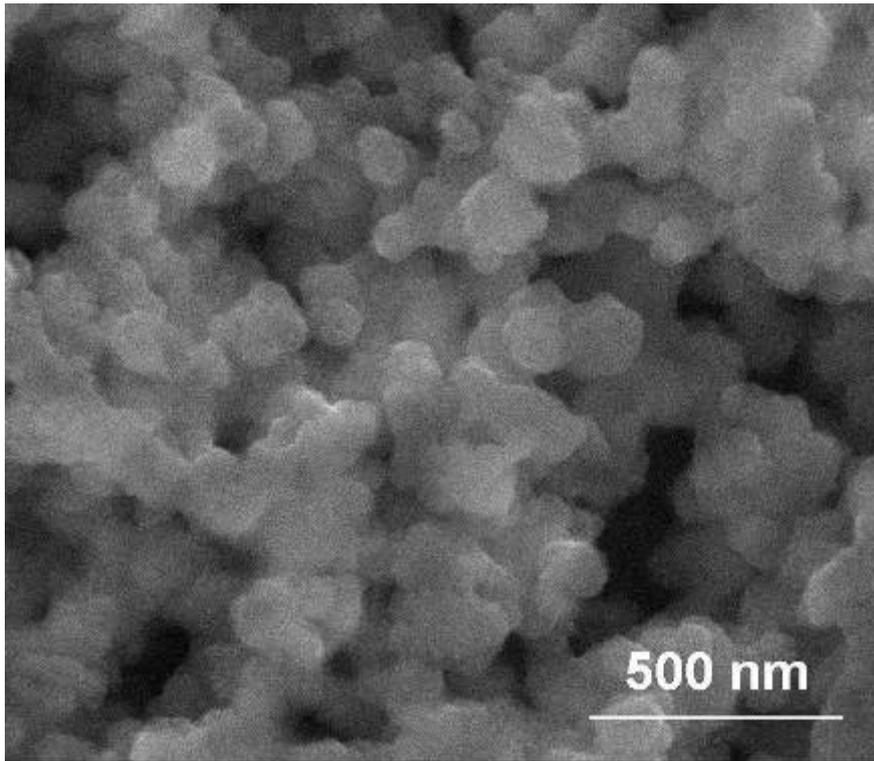


Figura 1b-1

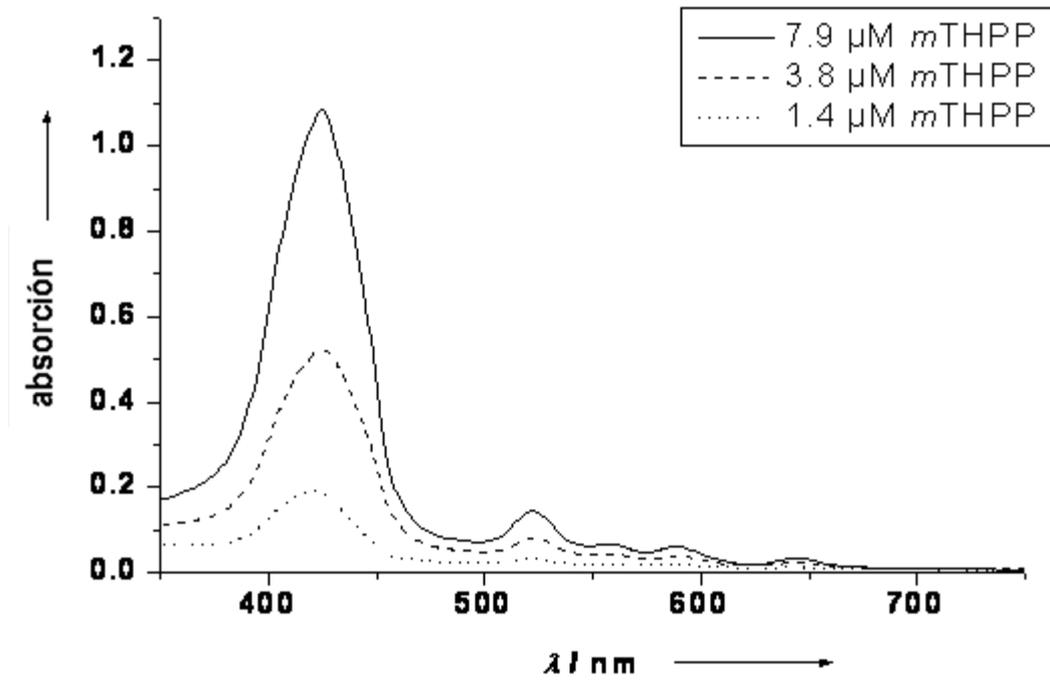


Figura 1b-2

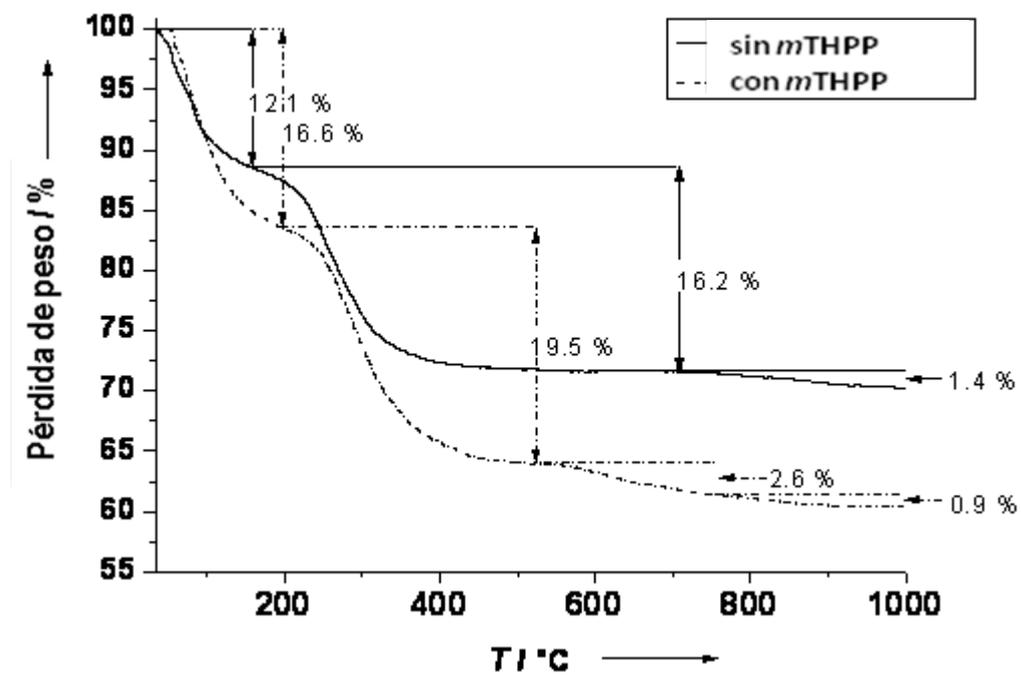


Figura 1b-3

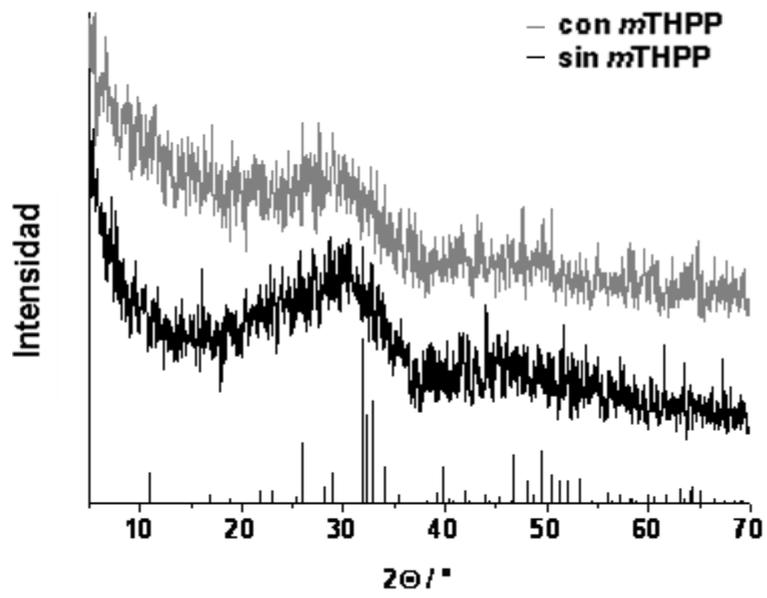


Figura 1b-4

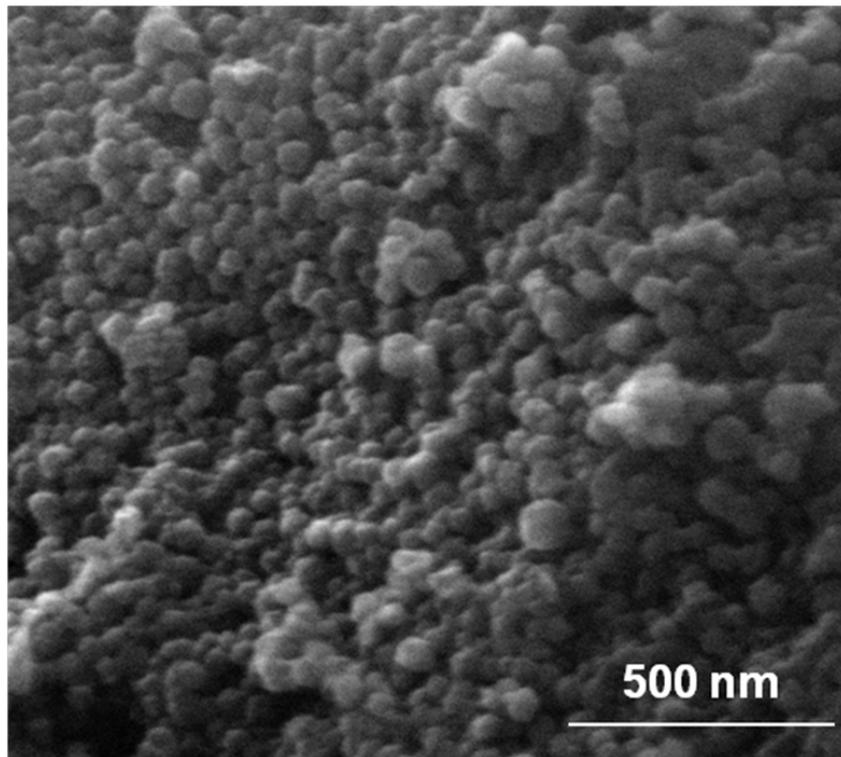


Figura 2-1

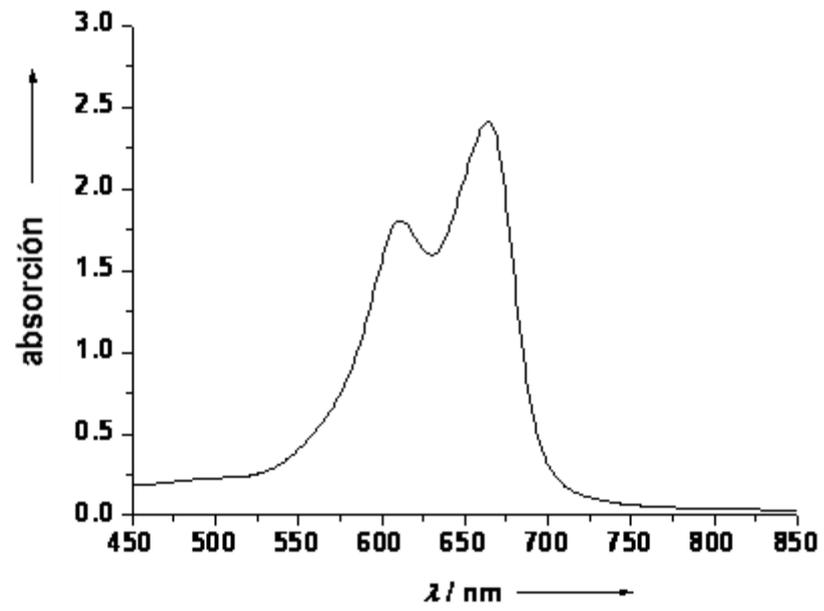


Figura 2-2

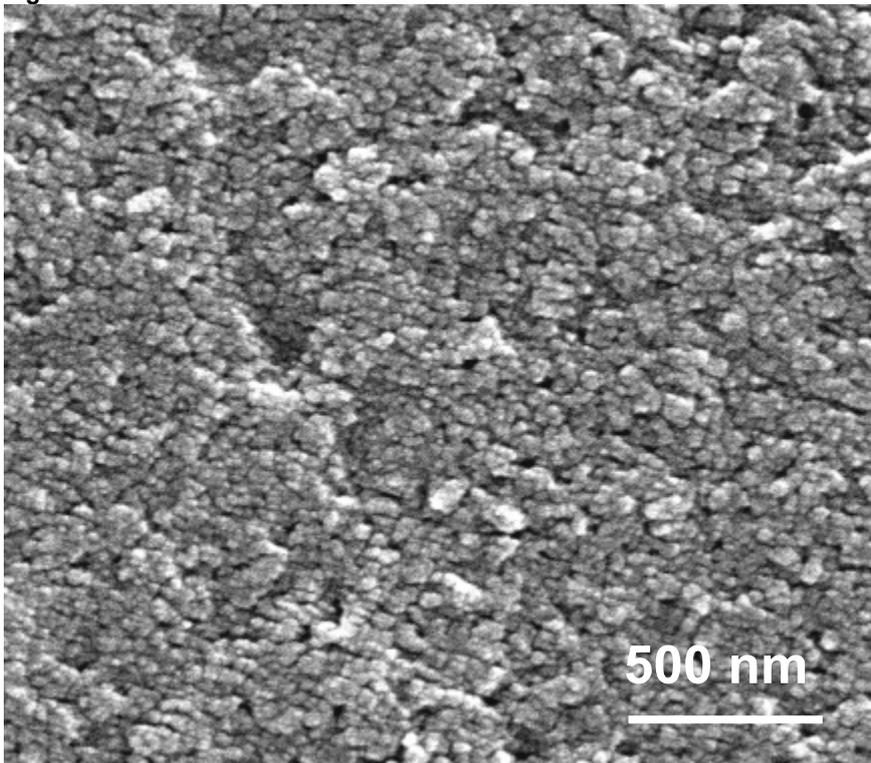


Figura 3-1

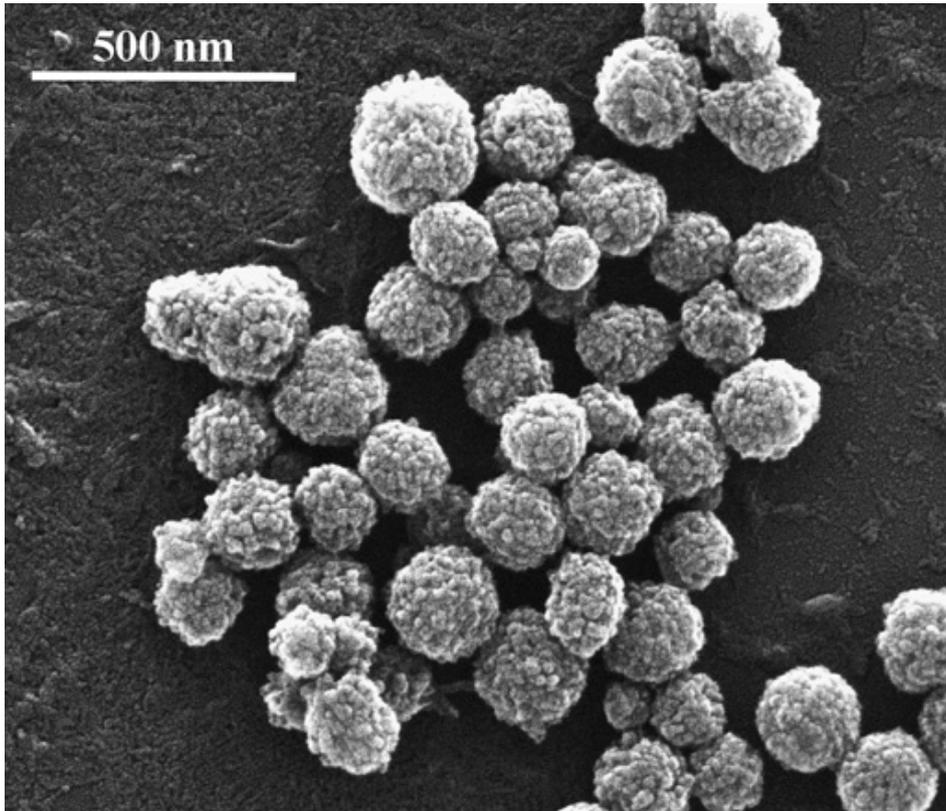


Figura 3-2

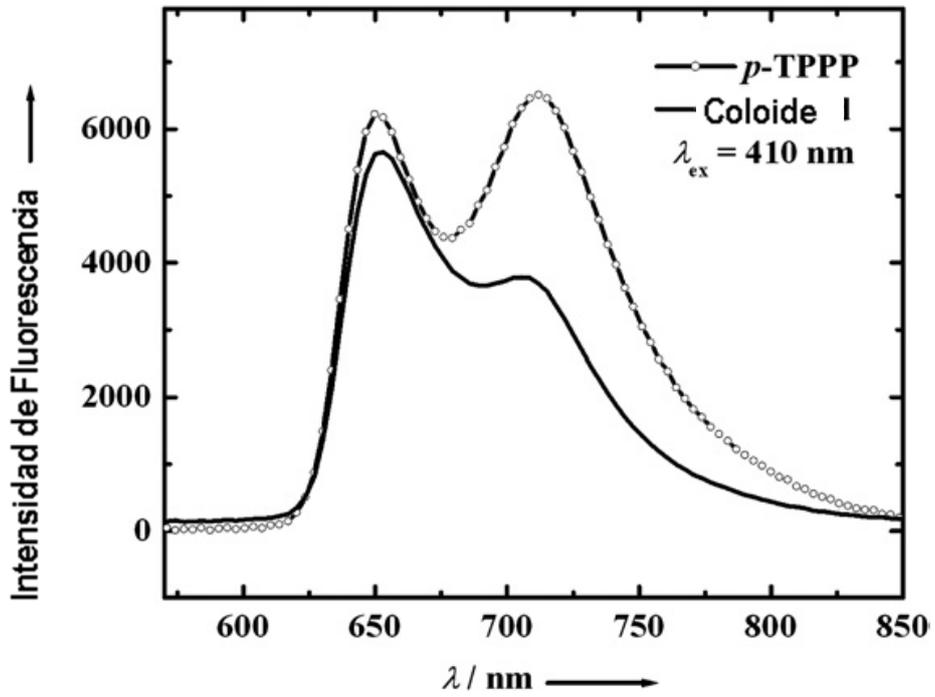


Figura 3-3

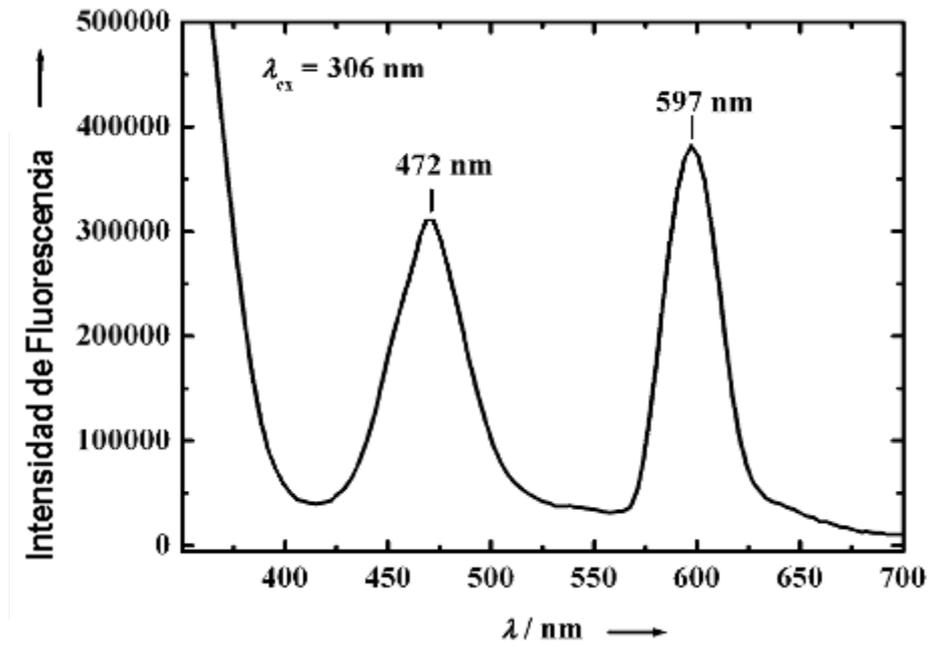


Figura 4

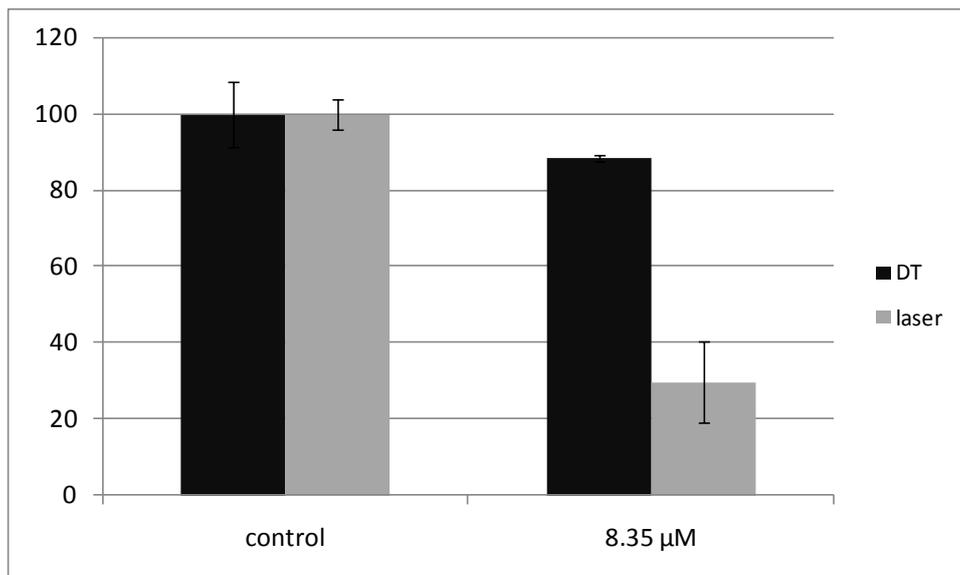


Figura 5

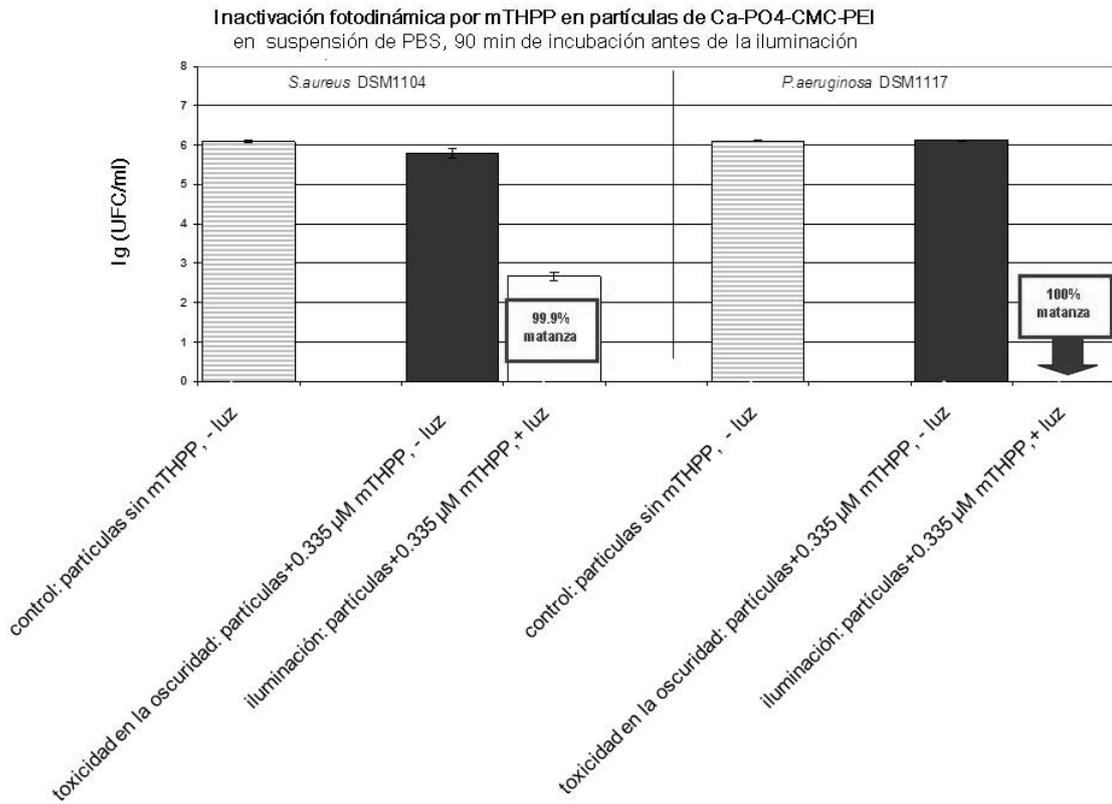
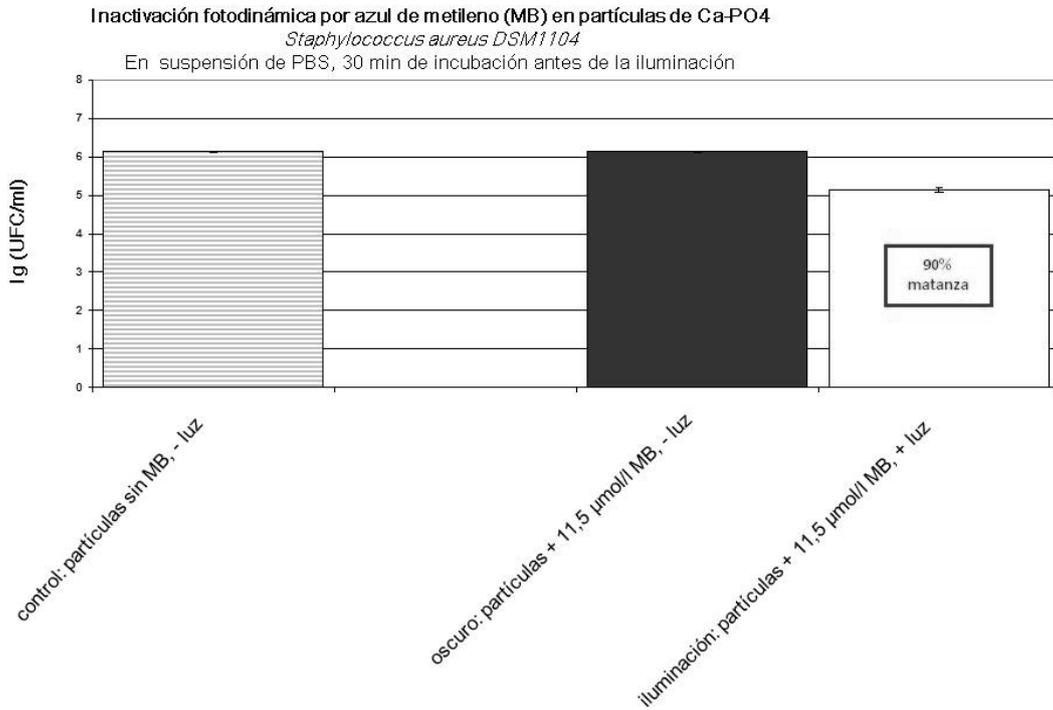


Figura 6

Figura 7

