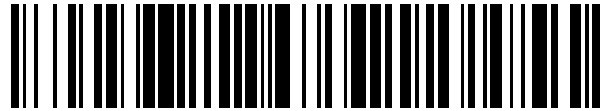


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 346**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06742238 .6**

96 Fecha de presentación: **12.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1871423**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Conjugados de nanopartículas-principios activos**

30 Prioridad:

**12.04.2005 DE 102005016873**

**27.04.2005 US 675100 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**07.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**07.12.2012**

73 Titular/es:

**MAGFORCE AG (100.0%)**  
**Max-Dohrn-Strasse 8Haus B 5.2**  
**10589 Berlin , DE**

72 Inventor/es:

**JORDAN, ANDREAS;**  
**WALDOEFNER, NORBERT;**  
**DECKEN, KLAUS y**  
**SCHOLZ, REGINA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 392 346 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

Conjugados de nanopartículas-principios activos.

5 La presente invención se refiere a nanopartículas, sobre las cuales se unen sustancias terapéuticamente activas, donde la liberación de la sustancia terapéuticamente activa es iniciada o esencialmente aumentada mediante un campo magnético alternante.

10 Se sabe que pueden emplearse nanopartículas superparamagnéticas como soporte de principios activos para el tratamiento de enfermedades. En ello se persiguen diferentes enfoques. Una estrategia conocida se basa por ejemplo en el denominado "foco medicinal magnético", en el cual se busca alcanzar un aumento local de la concentración del principio activo por medio de un campo magnético (DE 10059151 A, Alexiou). Así mismo, se busca impartir por vía química a las partículas propiedades radiogoniométricas, para alcanzar de este modo enriquecimiento en determinadas regiones del cuerpo (DE 4428851 A1, EP 0516252 A2). En el escrito de patente WO 98/58673 (INM) se describen partículas con varias conchas para la introducción de conjugados de partícula-principio activo en células de tumores.

15 WO 2005/070471 A2 manifiesta partículas terapéuticas magnéticas, que incluye material magnético y material bioactivo.

En WO 02/43708 A2 se describen partículas magnéticas para la terapia orientada a un objetivo regional de enfermedades en seres humanos.

20 La patente de EEUU Nr. 5, 411, 730 manifiesta partículas superparamagnéticas para la aplicación medicinal incluyendo técnicas hipertérmicas, calentamiento local y la liberación específica sobre tejidos de agentes terapéuticos.

De WO 2005/042142 se conocen soportes de polímeros termosensibles biocompatibles con estructura que puede ser cambiada físicamente para la terapia, diagnóstico y análisis.

25 WO 03/026618 A1 describe métodos no invasivos para la localización focalizada de moléculas biológicamente activas que incluyen partículas termosensibles con moléculas introducidas allí, que son administradas al paciente y de las cuales es liberada la molécula empleando una fuente de energía.

De la WO 2004/0655282 A2 se conoce el empleo de partículas magnéticas de compuestos con campos magnéticos para el tratamiento de enfermedades como por ejemplo cáncer.

30 Es objetivo de la presente invención cargar nanopartículas con sustancias terapéuticamente activas, de tal modo que en tejidos saludables no tenga lugar ninguna liberación digna de mencionarse de la sustancia terapéuticamente activa y después de la entrada de la nanopartícula en el tejido tumoral y en las células tumorales pueda ocurrir una liberación controlada de la sustancia terapéuticamente activa.

El objetivo es logrado mediante las nanopartículas según la reivindicación 1 así como la mezcla farmacéutica según la reivindicación 12 y el empleo de las nanopartículas según la reivindicación 13.

Otras modificaciones ventajosas surgen de las reivindicaciones subordinadas, de los ejemplos y de la descripción.

35 La presente invención se refiere a nanopartículas, donde en la nanopartícula y donde el desprendimiento de la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa de la nanopartícula es causado, iniciado o esencialmente aumentado mediante un campo magnético alternante. En ello, la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa está unida a una molécula de enlace, donde la molécula de enlace contiene un grupo termolábil, electro-  
40 magnéticamente lábil, fotolábil, lábil a los ácidos, que puede estar intercalado o que puede ser escindido enzimáticamente y donde la molécula de enlace es una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un péptido-ácido nucleico, un aptámero, ADN, ARN, una cremallera de leucina, un oligonucleótido, un oligopéptido, un puente hapteno- anticuerpo o un puente biotina-avidina, o donde en la molécula de enlace está presente una unión de biotina a avidina o a estreptavidina, se libera por lo menos una sustancia terapéuticamente activa mediante la influencia directa del campo magnético alternante o mediante el calentamiento local debido al campo magnético  
45 alternante. La liberación ocurre preferiblemente mediante la escisión térmica de un molécula de enlace termolábil entre el principio activo, es decir la sustancia terapéuticamente activa y la nanopartícula y/o el empleo de un molécula de enlace, la cual es lábil respecto a un campo magnético alternante. Por consiguiente, la presente invención consiste en unir a una nanopartícula una sustancia terapéuticamente activa, en particular un citostático, mediante una molécula de enlace que puede ser escindida por vía térmica y/o mediante un campo magnético.

50 Las nanopartículas acordes con la invención se caracterizan porque a la nanopartícula está unida por lo menos una sustancia terapéuticamente activa mediante una molécula de enlace y donde la separación de la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa de la nanopartícula es causada o iniciada o esencialmente aumentada por un campo magnético alternante.

Dicho de otro modo, la presente invención se refiere a nanopartículas, donde a la nanopartícula está unida por lo menos una sustancia terapéuticamente activa, de modo covalente o iónico o mediante puentes de hidrógeno o mediante compuestos complejos o por intercalación o mediante interacción lipófila por medio de un molécula de enlace y donde la molécula de enlace puede ser iniciada térmicamente y/o iniciada mediante un campo electromagnético o bien campo magnético.

Escisión iniciada térmicamente significa que un calentamiento local por encima de 45°C, preferiblemente por encima de 50°C es suficiente bajo condiciones fisiológicas para escindir la molécula de enlace. Una escisión iniciada mediante un campo electromagnético o bien magnético significa que bajo condiciones fisiológicas, la aplicación de un campo electromagnético o bien magnético causa una escisión de la molécula de enlace, sólo por el campo electromagnético o bien magnético y/o por una reducción local del valor de pH, el cual es provocado por el campo electromagnético o bien magnético.

La unión de la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa, es decir la molécula de por lo menos una categoría de sustancia terapéuticamente activa o un determinado principio activo ocurre preferiblemente de modo covalente o por un enlace predominantemente covalente y/o por un enlace con la suficiente fuerza iónica, enlace de almacenamiento o formación de complejo, o bien una disposición de un número suficiente de enlaces de fuente de hidrógeno o hidrófobo. Un campo magnético alternante actúa como estímulo externo, que en el caso de partículas superparamagnéticas activa diferentes procesos de relajación de la partícula. Estos procesos conducen entre otros a un calentamiento de la partícula y sus alrededores. Estos procesos activados mediante el campo magnético alternante son usados de acuerdo con la invención para escindir el enlace entre la nanopartícula y la sustancia terapéuticamente activa o acelerar fuertemente la escisión. En ello por ejemplo mediante el impulso puede elevarse fuertemente la velocidad de la escisión por procesos biológicos (por ejemplo enzimáticamente), de modo que sólo hasta que se ha activado el impulso puede alcanzarse una elevación sostenible en la concentración del principio activo en el lugar objetivo. Así mismo, puede construirse el enlace de modo que se active o acelere apreciablemente una escisión mediante reacciones químicas (por ejemplo hidrólisis). Además, mediante el calentamiento inducido por el campo magnético puede ocurrir la fusión de una molécula de ácido nucleico o polipéptido empleada como molécula de enlace.

Las sustancias terapéuticamente activas están unidas a una molécula de enlace. La molécula de enlace está unida preferiblemente por medio de un enlace amido o enlace éster a la nanopartícula o bien a la respectiva nanopartícula.

Como moléculas de enlace pueden emplearse de acuerdo con la invención también ácidos nucleicos (ácido desoxiribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o ácido peptidonucleico (APN)) o polipéptidos de diferente longitud. Las moléculas requeridas pueden ser producidas opcionalmente por técnica genética o sintéticamente. Las moléculas de enlace pueden ser escindidas bajo condiciones fisiológicas mediante inducción térmica, inducción magnética o inducción ácida.

Escisión de la molécula de enlace significa que la molécula de enlace contiene por lo menos una unión dentro de la molécula de enlace, la cual puede ser escindida bajo condiciones fisiológicas mediante la influencia del calor, influencia de un campo magnético, es decir impulsos magnéticos o mediante la influencia ácida. La escisión de esta unión debería transcurrir mediante la influencia del calor (preferiblemente por lo menos 45°C) y/o del campo magnético y/o de ácidos bajo condiciones fisiológicas, con una rapidez de por lo menos dos veces de aquella que no tiene esta influencia. La formación de ácido y la reducción del valor local de pH pueden originarse por ejemplo por células ya muertas. El concepto "unión dentro de la molécula de enlace" incluye también la unión de la molécula de enlace a la nanopartícula así como la unión de la molécula de enlace a la sustancia terapéuticamente activa. Además, la molécula de enlace puede componerse también de dos o tres moléculas de enlace.

La envoltura o bien el revestimiento que porta grupos amino o aminosilano pueden resultar en un acoplamiento del principio activo por ejemplo en grupos amino cercanos a la superficie. Para esto puede ocurrir un acoplamiento por ejemplo sobre succinimidil-ésteres, sulfosuccinimidil-ésteres, isotiocianatos, cloruros de triazinilo, cloruros de sulfonilo, tetrafluorofenil-ésteres o también sobre grupos aldehído. Es una premisa que el principio activo pueda ser dotado por vía química con tales grupos. Si no debiera ser posible un acoplamiento directo del principio activo por estos métodos, es posible el empleo de una "molécula de enlace". Este "molécula de enlace" se une al principio activo con los grupos funcionales de la envoltura protectora y ofrece con ello una elevada variabilidad de posibilidades acoplamiento. De acuerdo con la invención, la molécula de enlace contiene un grupo que puede ser intercalado, está intercalado o que puede ser escindido enzimáticamente, termolábil, electromagnéticamente lábil, fotolábil, lábil al ácido. Además puede regularse también el mecanismo de liberación de la molécula de enlace. De este modo pueden introducirse en la molécula de enlace también grupos que hacen posible una escisión del principio activo. Entran en consideración por ejemplo grupos acetal, ester, hidrazona o imina que pueden ser escindidos con el pH. Así mismo son adecuadas como moléculas de enlace secuencias de péptido, las cuales liberan el principio activo sólo hasta una escisión enzimática o una fusión de un enlace no covalente. Además entran en consideración moléculas de ADN, ARN y APN como moléculas de enlace de doble cuerda preferidos, donde la liberación ocurre por una fusión inducida térmicamente de la doble cuerda.

De acuerdo con la invención, pueden emplearse sólo moléculas de enlace, que bajo condiciones fisiológicas normales no causan ninguna tasa de escisión o causan sólo tasas de escisión lenta. Las moléculas de enlace pueden estar construidas por ejemplo de modo que en si bien es posible una liberación en el ámbito objetivo (por ejemplo enzimática en las células tumorales), bajo condiciones normales ésta es tan lenta que no puede alcanzarse ninguna concentración terapéutica del principio activo. Sólo mediante el impulso externo del campo magnético alternante inicia la escisión de la molécula de enlace o bien el desdoblamiento de la molécula de enlace en una velocidad suficiente y conduce a una activación del principio activo. Eso es alcanzado preferiblemente mediante la adopción por parte de la molécula de enlace empleado de una conformación que hace posible un desdoblamiento enzimático, sólo después de una fusión inducida térmicamente de ácido nucleico de doble cuerda o bien de varias cuerdas o alternativamente de dímeros de péptido o bien oligómeros de péptido.

Así mismo como en el caso de partículas estabilizadas con aminosilano, puede procederse con otras partículas magnéticas estabilizadas mediante diferentes grupos funcionales (por ejemplo carboxi, epoxi, aldehído). Es determinante que el método de acoplamiento sea elegido de modo que ocurra una liberación sólo bajo las interacciones arriba mencionadas, de modo que permanezca ampliamente detenida una liberación no controlada de sustancia terapéuticamente activa. Se entiende como liberación no controlada el desprendimiento de sustancia terapéuticamente activa en el tejido saludable, en particular el desprendimiento sin el efecto de un campo magnético alternante.

Una liberación no controlada tal, conduce a que se liberen sustancias terapéuticamente activas en lugares donde ellas causan como efectos terapéuticos efectos secundarios más bien dañinos, es decir por fuera del tejido canceroso o bien de las células tumorales.

Las sustancias terapéuticamente activas permanecen con ello unidas fijamente a la nanopartícula y son transportados junto con las nanopartículas a las células cancerosas. A lo largo de la vía de las nanopartículas hacia las células cancerosas se libera sólo una pequeña cantidad, justo hasta una cantidad despreciable de la sustancia terapéuticamente activa. Al arribar a las células cancerosas ocurre entonces la liberación de la sustancia terapéuticamente activa por medio de un campo magnético alternante, en particular un campo magnético alternante externo o bien campo magnético alternante externo aplicado (impulso).

En esta relación, "causado o iniciado por un campo magnético alternante", significa que por un lado el campo magnético alternante o bien el impulso causan directamente la liberación o bien desprendimiento o indirectamente por ejemplo mediante la activación o bien inducción causan la expresión de gen de enzimas o la generación de calor.

Las nanopartículas en sí mismas consisten en un material magnético, preferiblemente un material ferromagnético, antiferromagnético, ferrimagnético, antiferrimagnético o superparamagnético, más preferiblemente de óxidos de hierro, en particular óxidos de hierro superparamagnéticos o de hierro puro que está provisto de una capa de óxido. Tales nanopartículas pueden ser calentadas mediante un campo magnético alternante. Es posible un calentamiento por encima de 50°C del tejido que contiene la nanopartícula. Tales temperaturas altas pueden ser alcanzadas puesto que pueden incorporarse hasta 800 pg y más de hierro en forma de la nanopartícula por célula tumoral.

Las nanopartículas consisten preferiblemente en óxidos de hierro y en particular en magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) o mezclas de estos dos óxidos. En general pueden reproducirse en las nanopartículas preferidas mediante la fórmula  $\text{FeO}_x$ , donde X significa un número de 1 a 2. Las nanopartículas exhiben preferiblemente un diámetro inferior a 500 nm. Preferiblemente las nanopartículas poseen un diámetro promedio de 15 nm o están preferiblemente en el rango de tamaño de 1 - 100 nm y en particular preferiblemente en el rango de 10 - 20 nm.

Aparte de los materiales magnéticos de la fórmula  $\text{FeO}_x$ , donde X es un número en el rango de 1,0 a 2,0, son utilizables de acuerdo con la invención también materiales de la fórmula general  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  con  $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Cd}, \text{Ba}$  u otras ferritas. Además son adecuadas también partículas de sílica o polímero, en las cuales están almacenados y/o unidos materiales magnéticos como por ejemplo los materiales magnéticos aquí mencionados.

Sobre estas nanopartículas, en particular nanopartículas superparamagnéticas se ligan ahora sustancias terapéuticamente activas donde se prefiere un enlace covalente. Como sustancias terapéuticamente activas pueden elegirse principios activos antiproliferativos, antimigratorios, antiangiogénicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, antiflogísticos, citostáticos, citotóxicos, anticoagulantes, antibacterianos, antivirales y/o antimicóticos, donde se prefieren principios activos antiproliferativos, antimigratorios, antiangiogénicos, citostáticos y/o citotóxicos así como ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, glicoproteínas, glicanos o lipoproteínas con propiedades antiproliferativas, antimigratorias, antiangiogénicas, antitrombóticas, antiinflamatorias, antiflogísticas, citostáticas, citotóxicas, anticoagulantes, antibacterianas, antivirales y/o antimicóticas. Además, que estas sustancias pueden ser también radiosensibilizadores o sustancias que generan sensibilidad o potenciadores de otros métodos convencionales también combinados para el tratamiento del cáncer o contener tales sustancias que generan sensibilidad.

Como compuestos citotóxicos y/o citostáticos, es decir compuestos químicos con propiedades citotóxicas y/o citostáticas pueden emplearse entre otros, agentes de adición de grupos alquilo, antibióticos con propiedades citostáticas, antimetabolitos, inhibidores de microtúbulos e inhibidores de topoisomerasa, compuestos que contienen platino y otros citostáticos como por ejemplo asparaginasa, tretinoína, alcaloides, podofilotoxinas, taxanos y Miltefosin®, hormonas, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales, transductores de señal (moléculas para transcripción de señal) y citoquinas.

Como ejemplos para adición de grupos alquilo pueden mencionarse entre otros cloretamina, ciclofosfamida, trofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucil, busulfan, tiotepa, carmustina, lomustina, dacarbazina, procarbazina, temozolomida, treosulfan, estramustina y nimustina.

Son ejemplos de antibióticos con propiedades citostáticas daunorubicina, doxorubicina (adriamicina), dactinomicina, mitomicina C, bleomicina, epirubicina (4-epi-adriamicina), idarubicina, dactinomicina, mitoxantron, amsacrina y actinomicina D.

Pueden citarse como ejemplos de antimetabolitos (principios activos antimetabólicos) metotrexato, 5-fluorouracilo, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, fludarabina, cladribina, pentostatina, gemcitabina, citarabina, azatioprina, raltitrexed, capecitabina, citosinarabinósido, tioguanina y mercaptopurina.

A la categoría de los alcaloides y podofilotoxinas pertenecen entre otros vincristina, vinblastina, vindesina, etopósido como también tenipósido. Además, pueden emplearse de acuerdo con la invención compuestos que contienen platino. Como compuestos que contienen platino se mencionan por ejemplo cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Entre los inhibidores de microtúbulos se cuentan por ejemplo alcaloides como por ejemplo vinca-alcaloides (vincristina, vinblastina, vindesina, venorelbina) y paclitaxel (Taxol®) así como derivados del paclitaxel. Como inhibidores de topoisomerasa pueden mencionarse por ejemplo etopósido, tenipósido, camptotecina, topotecan e irinotecan.

Paclitaxel y docetaxel son ejemplos de categorías de compuestos de los taxanos y entre los otros principios activos citostáticos (otros citostáticos) se cuentan por ejemplo hidroxycarbamidas (hidroxiurea), imatinib, Miltefosin®, amsacrina, topotecan (inhibidor I de topoisomerasa), pentostatina, bexaroten, Biolimus A9, rapamicina (Sirolimus), rodomicina D, ametantrona, bendamustina, oxazafosforina, 5'-desoxi-5-fluorouridina, 9-aminocamptotecina, derivados de podofilotoxina, mitopodozide, alcaloides vinca, calicheamicina, maitansinoide, tretinoína y asparaginasa. Son representantes de la categoría de compuestos de los anticuerpos monoclonales entre otros Trastuzumab (también conocido como Herceptin®), Alemtuzumab (también conocido como MabCampath®) y Rituximab (también conocido como MabThera®).

De acuerdo con la invención pueden emplearse también hormonas como por ejemplo glucocorticoides (prednisona), estrógenos (fosfestrol, estramustina), LHRH (buserelina, goserelina, leuprorelina, triptorelina), flutamida, acetato de ciproterona, tamoxifen, toremifen, aminoglutetimida, formestán, exemestán, letrozol y anastrozol. En la categoría de los inmunomoduladores, citoquinas, anticuerpos y transductores de señal se cuentan interleuquina-2, interferon- $\alpha$ , eritropoietina, G-CSf, Trastuzumab (Herceptin®), Rituximab (MabThera®), Efitinib (Iressa®), Ibritumomab (Zevalin®), Levamisol así como retinoides.

Los principios activos están unidos preferiblemente de modo covalente a la nanopartícula. La unión de los principios activos puede ocurrir por ejemplo por grupos hidroxilo, grupos amino, grupos carbonilo, grupos tiol o grupos carboxilo, dependiendo de cuáles grupos funcionales porten el respectivo principio activo. De este modo por ejemplo doxorubicina puede estar unida como éster sobre su grupo hidroxilo primario, derivados de platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino ect.) estar acoplados por medio de sustitución nucleofílica al platino en un grupo amino, o paclitaxel estar ligado con una unión imino.

Los grupos hidroxilo están unidos preferiblemente como éster, acetal o cetal, los grupos tio preferiblemente como tioéster, tioacetal o tiocetal, grupos amino preferiblemente como amidas y parcialmente también como iminas (bases Schiff) o mediante reacción con un grupo isocianato como uretano, grupos carboxilo preferiblemente como ésteres o amidas y grupos carbonilo preferiblemente como acetales o bien cetales.

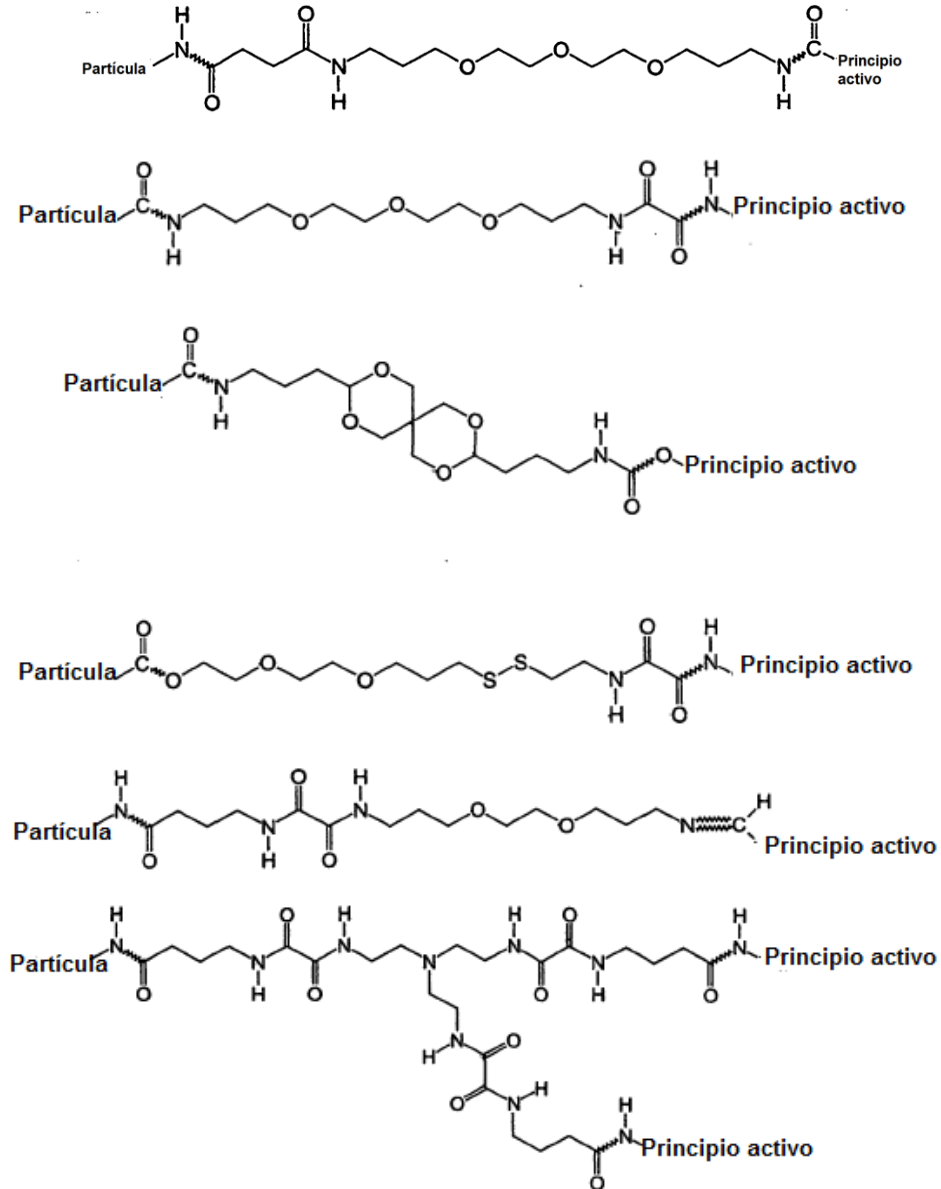
La producción de nanopartículas, aunque sin principio activo y también sin revestimiento es detalladamente descrita en DE 4428851 A. Además se conoce la adición de grupos funcionales a la superficie de las nanopartículas, de modo que según métodos conocidos pueden generarse grupos amino, grupos hidroxilo, grupos carboxilo o grupos carbonilo en la superficie de las nanopartículas.

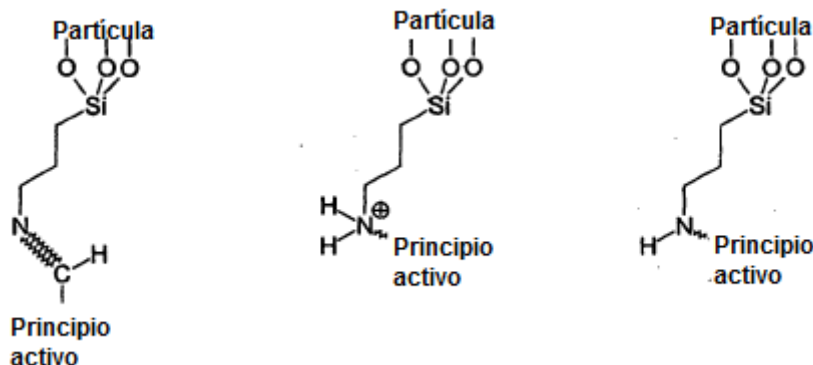
De allí que la presente invención se refiere a nanopartículas que disponen de una multiplicidad de grupos amino, grupos hidroxilo, grupos carboxilo o grupos carbonilo en la superficie, y donde en por lo menos una parte de estos grupos funcionales está unida la molécula de enlace por medio de una unión imina, unión amina, unión éster, unión amida o unión cetal y además que esta molécula de enlace se une a la sustancia terapéuticamente activa de modo covalente, iónico, de complejo, lipofílico o mediante puentes de hidrógeno.

Un rasgo particular de una forma preferida de operar de la nanopartícula acorde con la invención es que el principio activo está acoplado mediante tipos especiales de enlace a la nanopartícula magnética. Estos enlaces están contruidos de manera que la liberación de los principios activos puede ser estimulada mediante un campo magnético alternante externo (impulso).

- 5 Para garantizar la capacidad requerida para ser escindido, la molécula de enlace exhibe por lo menos uno de los siguientes grupos funcionales: -S-S-, -O-P(=O)(O-)-O-, -CO-CO-, -NH-CO-CO-NH-, -C=N-C, cetales, -CO-NH-N=C, trioxisilanos (-O-)(-O-)(-O-)S-C o acetales.

Las moléculas de enlace adecuados tienen por ejemplo la siguiente forma:





La línea en zigzag indica el enlace entre principio activo y molécula de enlace o molécula de enlace y nanopartícula.

5 Como ácidos nucleico se prefieren aquellos fragmentos - preferiblemente de doble cuerda- que exhiben un punto de fusión en el rango de 40-60°C. En el empleo de ADN, ARN o APN de doble cuerda, una cuerda dispone de un grupo que tiene la capacidad de un acoplamiento con la partícula (por ejemplo un grupo amino o grupo carboxi, el cual está acoplado a un grupo fosforamidato). La cuerda complementaria puede portar por ejemplo el principio activo, el cual así mismo está acoplado mediante un enlace covalente. A través de los pares de bases entre las cuerdas se acopla a la partícula de este modo también el principio activo. Ahora puede ocurrir una liberación del principio activo a través de la fusión de la doble hélice por desarrollo de calor en el campo magnético alternante. En 10 ello se separan la cuerda individual y la sustancia activa de la partícula. Mediante la elección de los correspondientes homo o hetero-híbridos de ADN-ADN, ADN-ARN, ADNAPN, ARN-ARN, ARN-APN o APN-APN se controla tanto el punto de fusión como también el comportamiento de degradación de la molécula de enlace.

15 Como polipéptidos se emplean preferiblemente aquellas moléculas, que tienen tendencia a la formación de homo- o hetero-dímeros definidos, en particular mediante uniones de puentes de hidrógeno (como por ejemplo entre dominios de inmunoglobulina) o interacciones hidrófobas (como por ejemplo en las denominadas cremalleras de leucina). También aquí se emplean de modo focalizado aquellos pares que poseen un punto de fusión en el rango de 40-60°C, que por consiguiente bajo condiciones fisiológicas están presentes predominantemente en estado pareado, pero que a temperaturas terapéuticamente alcanzables se descomponen en sus monómeros. Para ello, 20 un asociado de enlace está acoplado de modo covalente a la nanopartícula, y el otro está acoplado de modo covalente con una sustancia terapéuticamente activa. La fusión de la unión entre las dos cuerdas de péptido conduce a un desacoplamiento de nanopartícula y sustancia terapéuticamente activa, la cual continuación - dado el caso por ejemplo no antes de la escisión enzimática - está presente en forma que puede difundirse libremente.

25 Similarmente pueden emplearse también interacciones polipéptido-ácido nucleico en una correspondiente molécula de enlace. Para ello, por ejemplo, a la nanopartícula se acoplan polipéptidos que se unen a ácidos nucleicos, los cuales interactúan de modo no covalente con los ácidos nucleicos. Estas interacciones pueden ser fundidas así mismo mediante la acción del calor, de modo que los ácidos nucleicos unidos son liberados junto con la molécula efectora acoplada. Dado el caso, también el ácido nucleico liberado puede actuar en sí mismo como molécula efectora (por ejemplo siARN, ADN antisentido, etc.). Como polipéptidos que se unen a ácidos nucleicos entran en 30 consideración en particular dedos de zinc con una longitud entre 20 y 50 aminoácidos, pero también entran en consideración el dominio que forma frecuentemente motivo de ADN hélice-giro-hélice o la denominada "proteína que se une a cuerda sencilla " (SSB) para la unión con ADN (una pequeña proteína con un dominio que se une a ADN de aproximadamente 100 aminoácidos) o bien la proteína que se une a ARN de cuerda sencilla "motivo de reconocimiento ARN " (RRM o bien RNP- 1) (en un entorno de aproximadamente 90 aminoácidos) o la proteína que se une a ARN de cuerda doble "motivo de unión con ARN de doble cuerda" (DRBM) (en el entorno de 35 aproximadamente 65 aminoácidos).

40 Como otra posibilidad puede emplearse exclusivamente también la unión de ligandos de bajo peso molecular mediante ácidos nucleicos (aptámeros) o bien proteínas en un sistema de molécula de enlace. Básicamente pueden emplearse todas las moléculas en las cuales por ejemplo se generan anticuerpos contra un así denominado "hapteno" (frecuentemente se emplean por ejemplo anticuerpos contra dinitrofenol, trinitrofenol, digoxigenina, digoxina, biotina). En particular son viables también bolsillos de enlaces de biomoléculas, por ejemplo para coenzimas (como coenzima A, ATP, GTP, FAD, NADH, NADPH, biotina, ácido fólico, piridoxalfosfato, etc.), 45 sustratos (como por ejemplo los puntos de unión de glutatión que incluye 73 aminoácidos de la glutatión-S-transferasa GST) u hormonas (como por ejemplo los dominios de unión de hormonas de los homoreceptores nucleares para andrógenos, estrógenos, ácido retinoico, tiroxina, vitamina D3 en el ámbito de 218 a 252 aminoácidos). Una de las interacciones más frecuentemente empleadas y al mismo tiempo de los enlaces no-covalentes más fuertemente conocidos es el de la biotina a la avidina o bien a estreptavidina. Con respecto a la elevada avididad de enlace aquí es posible usar como alternativa avidina modificada o bien análogos de biotina

(acaso destiobiotina o iminobiotina) con un enlace débil, para alcanzar una fusión en el rango de temperatura que puede ser alcanzado técnicamente. En todos los casos, tiene sentido acoplar los ligandos micromoleculares en la molécula efectora y los ligandos macromoleculares a la nanopartícula; dependiendo de la elección del ligando puede ser ventajosa también la disposición inversa.

5 Por consiguiente, sólo entran en consideración como métodos de acoplamiento para estas formas preferidas de operar, los que generan un enlace entre la nanopartícula y el principio activo, que bajo condiciones fisiológicas "normales" exhibe una estabilidad sobresaliente, pero que bajo las condiciones aplicadas de acuerdo con la invención (impulso) es esencialmente inestable. El verdadero mecanismo de liberación y con ello también el tipo de enlace depende del sitio objetivo (por ejemplo tumor en enfermedades de cáncer) y tiene que poder ser ajustado  
10 por medio de los métodos corrientes de acoplamiento químico. Así mismo, la liberación puede ocurrir de modo intracelular (por ejemplo en células tumorales) o de modo extracelular. Las partículas producidas de acuerdo con la invención se diferencian por consiguiente de los soportes ya conocidos de principios activos en que primero puede alcanzarse una eficacia mediante la activación del campo magnético alternante, mientras que el principio activo es ampliamente inactivo sin este impulso.

15 De acuerdo con la invención, los conjugados de nanopartícula-principio activo que pueden ser activados se basan preferiblemente en núcleos magnéticos que contienen hierro, que están rodeados por una o varias envolturas o revestimientos coloidales, los cuales ofrecen una posibilidad para el acoplamiento de los principios activos sobre grupos funcionales. En ello, el núcleo consiste preferiblemente en magnetita o maghemita. La función primordial de la envoltura es alcanzar una distribución coloidal en el medio acuoso y proteger la nanopartícula ante  
20 aglomeraciones. Las partículas envueltas en varias capas, como se describe en WO 98/58673, son adecuadas en principio como base para conjugados de nanopartícula-principio activo que pueden ser activados, puesto que el comportamiento biológico de tales partículas puede ser ajustado mediante sobre-revestimientos con polímeros y es posible un acoplamiento de los principios activos a grupos funcionales de la envoltura primaria.

25 Los principios activos pueden ser acoplados mediante diferentes métodos a la envoltura primaria. En el evento, ocurre una estabilización del núcleo de la partícula mediante condiciones. Así mismo, es posible acoplar un principio activo en un alcoxilano que tiene los grupos funcionales arriba mencionadas (ver Ejemplo 1), donde en una etapa subsiguiente este conjugado es acoplado a la envoltura protectora de partículas ya estabilizadas mediante silanos. En ello, el acoplamiento no está limitado a enlaces covalentes. De acuerdo con la invención pueden generarse también interacciones iónicas de suficiente estabilidad.

30 Así mismo es posible otro revestimiento de los conjugados nanopartícula-principio activo que pueden ser activados (por ejemplo mediante polímeros), como se describe en el escrito de patente WO 98/58673 y puede ser empleado para mejorar las propiedades biológicas del conjugado partícula-principio activo. Así mismo pueden acoplarse otras moléculas, que dotan a la totalidad del fragmento de propiedades de localización del destino (por ejemplo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos  
35 quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, fragmentos Fab, fragmentos Fc, péptidos, peptidomiméticos, gap-meros, ribozimas, oligómeros CpG, ADN-zimas, ribo-interruptores, o lípidos). Es un requerimiento que todas las otras modificaciones no impidan la liberación que puede ser activada del principio activo en el lugar de destino.

40 Con ello, como moléculas de enlace pueden requerirse diversas moléculas con hasta 500 átomos de carbono o 10 a 30 pares de bases, preferiblemente 15 - 25 pares de bases o 10 - 30 aminoácidos, preferiblemente sirven 15 - 25 aminoácidos, la molécula de enlace contiene un grupo que puede ser escindido por vía térmica, fotoquímica o enzimática, grupo lábil al ácido o grupo que puede ser removido fácilmente de otro modo. Con ello, una unión en la molécula de enlace y/o la unión de la molécula de enlace con el principio activo y/o la unión de la molécula de enlace con la superficie de la nanopartícula tienen que poder ser escindidas mediante el efecto del campo  
45 magnético alternante, sea directa o indirectamente. Se presenta entonces una escisión indirecta, cuando por ejemplo mediante el campo magnético alternante, enzimas como por ejemplo peptidasas, esterases o hidrolasas en el lugar de destino, por ejemplo en las células cancerosas, inducen o se eleva su actividad o expresión y estas enzimas pueden provocar la escisión previamente mencionada. Además, puede ocurrir una escisión indirecta mediante la aplicación de nanopartículas magnéticas, cuando éstas son calentadas mediante el campo magnético  
50 alternante y mediante ello se escinde un enlace térmicamente lábil. También es imaginable la elevación del valor de pH en el lugar de destino mediante la acción del campo magnético alternante y la subsiguiente escisión de enlaces lábiles al ácido en la molécula de enlace.

55 Como grupos que pueden ser escindidos enzimáticamente en la o de la molécula de enlace son de mencionar los grupos éster y los grupos amido o bien péptido. Los grupos que pueden ser escindidos térmicamente o por medio de ácidos incluyen por ejemplo grupos fosfato, grupos tiosulfato, grupos sulfato, grupos fosfamido, grupos carbamato o grupos imino.

El principio activo no tiene que estar necesariamente unido de modo covalente a la molécula de enlace, sino que puede estar unido también en forma iónica o mediante puentes de hidrógeno o estar intercalado o formando complejos.



Además existe la posibilidad también de enlazar los principios activos por vía adsorptiva a la superficie de las nanopartículas y recubrir con una capa de barrera, la cual impide ampliamente la liberación del principio activo hasta que la capa de barrera es modificada, en particular degradada, mediante el efecto de un campo magnético alternante, de tal modo que puede ocurrir la liberación del principio activo.

- 5 En otra forma preferida de operar de las nanopartículas acordes con la invención, son rodeadas o bien recubiertas con una o varias envolturas o revestimientos. Estas envolturas o revestimientos pueden cumplir una o varias funciones y pueden servir como envoltura protectora, capa de barrera o revestimiento selectivo frente a las células.

10 Para el caso de un enlace solamente débil de la sustancia terapéuticamente activa con la nanopartícula, por ejemplo por un enlace no covalente, iónico, por adsorción, lipofílico y/o de Van der Waals y/o una unión mediante puentes de hidrógeno, una envoltura protectora o revestimiento de barrera puede prevenir la liberación de las sustancias terapéuticamente activas, hasta que la nanopartícula haya alcanzado su lugar de destino. En lugar de esta envoltura protectora o revestimiento de barrera o como otra capa sobre esta envoltura protectora o revestimiento de barrera, puede aplicarse una capa externa la cual porta funcionalidades específicas para las células.

15 Este revestimiento específico para las células eleva la afinidad de la nanopartícula hacia determinadas células como por ejemplo hacia determinadas células bacterianas o hacia determinadas células tumorales y sirve con ello para la discriminación celular. Tales nanopartículas específicas para las células se acumulan preferiblemente en aquellas células hacia las cuales ellas tienen una elevada actividad debido a la funcionalidad de su superficie y con ello son específicas para los tumores. Con esta tecnología se desarrollan por ejemplo nanopartículas específicas  
20 para los tumores para determinados tipos de cáncer.

Además, las nanopartículas pueden ser estabilizadas también mediante una envoltura coloidal protectora, la cual protege la nanopartícula de una aglomeración. Se prefiere cuando tales envolturas protectoras o revestimientos exhiben grupos amino o grupos carboxi. Para las/los envolturas protectoras o bien revestimientos pueden emplearse polímeros biológicos, sintéticos o semisintéticos. Para la generación de una capa de barrera se emplean  
25 preferiblemente polímeros bioestables, es decir ampliamente resistentes frente a la degradación biológica. Para la generación de envolturas o bien revestimientos específicos para las células se emplean preferiblemente polímeros que pueden ser degradados biológicamente.

Como polímeros bioestables pueden emplearse: ácido poliacrílico y poliacrilatos como polimetilmetacrilato, polibutilmetacrilato, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliamidas, polieteramidas, polietilnamina, poliimidias,  
30 policarbonatos, policarbouretanos, polivinilcetonas, halogenuros de polivinilo, halogenuros polivinilideno, poliviniléteres, poliisobutileno, polivinilaromáticos, polivinilésteres, polivinilpirrolidona, polioximetileno, óxido de politetrametileno, polietileno, polipropileno, politetrafluoretano, poliuretanos, polieteruretano silicona-polieteruretano, silicona-poliuretano, silicona-policarbonato-uretano, elastómeros de poliolefina, poliisobutileno, gomas EPDM, fluorosilicona, carboximetilquitosano, poliarileteretercetonas, polieteretercetonas,  
35 polietilentereftalato, polivaleratos, carboximetilcelulosa, celulosa, rayón, rayontriacetato, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, hidroxietilcelulosa, butirato de celulosa, acetatobutirato de celulosa, copolímero de acetato de etilvinilo, polisulfona, resina epóxica, resina ABS, gomas EPDM, siliconas como polisiloxano, polidimetilsiloxano, polivinilhalógenos y copolímeros, éteres de celulosa, triacetatos de celulosa. Quitosan y copolímeros y/o mezclas de estas sustancias.

40 Como polímeros que pueden ser degradados biológicamente pueden emplearse: polivalerolactona, poli- $\epsilon$ -decalactona, ácido polilactónico, polilacturo de ácido poliglicólico, poliglicólidos, copolímeros de los polilacturos y poliglicólidos, poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácido polihidroxitútrico, polihidroxituratos, polihidroxitvaleratos, polihidroxitbutirato-co-valeratos, poli(1,4-dioxan-2,3-diona), poli(1,3-dioxan-2-ona), poli-para-dioxanona, polianhídridos como anhídrido polimaleico, polihidroxitmetacrilatos, fibrina, policianoacrilatos,  
45 policaprolactondimetilacrilatos, ácido poli- $\beta$ -maleico policaprolactonbutilacrilatos, copolímeros de multibloque como por ejemplo de oligocaprolactondioles y oligodioxanondioles, polímeros de multibloque de polieteréster como por ejemplo PEG y poli(butilentereftalato), polipivotolactonas, trimetilcarbonato de ácido poliglicólico policaprolactona-glicoluro, poli( $\gamma$ -etilglutamato), poli(DTH-iminocarbonato), poli(DTE-co-DT-carbonato), poli(bisfenolA-  
50 iminocarbonato), poliorioéster, trimetilcarbonato de ácido poliglicólico, politrimetilcarbonatos poliiminocarbonatos, poli(N-vinil)-pirrolidona, polivinilalcoholes, poliesteramidas, poliésteres glicolados, polifosfoésteres, polifosfazeno, poli[(p-carboxifenoxi)propano] ácido polihidroxitpentanoico, polianhídridos, óxido de polietileno oxidpropileno, poliuretanos con radicales aminoácido en el esqueleto, polieterésteres como el óxido de polietileno, polialquenoxalatos, poliorioésteres así como sus copolímeros, lípidos, carragenanos, fibrinógeno, almidones, colágeno, polímeros a base de proteínas, poliaminoácidos, poliaminoácidos sintéticos, zeína, zeína  
55 modificada, polihidroxitlcanoatos, ácido pectínico, ácido actínico, fibrina y caseína modificadas y no modificadas, carboximetilsulfato, albumina, ácido hialurónico, quitosano y sus derivados, heparansulfatos y sus derivados, heparina, condroitinsulfato, dextran,  $\beta$ -ciclodextrinas, alginatos, glicosaminoglicanos, sacáridos, polisacáridos, proteoglicanos, glicoproteínas, copolímeros con PEG y polipropilenglicol, goma arábiga, goma guar, gelatina, colágeno, colágeno-N-hidroxisuccinimida, lípidos, fosfolípidos, modificaciones y copolímeros y/o mezclas de las  
60 sustancias previamente mencionadas.

Para el incremento adicional de afinidad respecto a determinadas células pueden acoplarse sobre la superficie de las nanopartículas o bien son la capa o envoltura exteriores de la nanopartícula, anticuerpos monoclonales y/o aptámeros. Los anticuerpos monoclonales y aptámeros están acondicionados de modo que ellos reconocen determinadas células, por ejemplo células tumorales e incrementan más la discriminación celular de la nanopartícula.

En una forma preferida de la presente invención el núcleo de las nanopartículas magnéticas consiste en magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) o mezclas de estos dos óxidos y son preferiblemente superparamagnéticos. Además, los núcleos están estabilizados mediante envolturas coloidales protectoras, las cuales hacen posible una unión de la sustancia terapéuticamente activa. Los conjugados de nanopartículas magnéticas y sustancias terapéuticamente activas están construidos mediante el tipo de enlace de modo que es posible una liberación focalizada de la sustancia terapéuticamente activa en el cuerpo humano, por medio de un campo magnético alternante externo (impulso).

Además, la presente invención se refiere a mezclas farmacéuticas, que contienen las nanopartículas acordes con la invención así como al empleo de nanopartículas acordes con la invención para la producción de tales mezclas farmacéuticas.

Estas mezclas farmacéuticas son en particular soluciones de infusión o inyección. Tales soluciones de las nanopartículas por ejemplo en solución fisiológica de sal son adecuadas para la aplicación intersticial o bien intratumoral. Una aplicación intraarterial o intravenosa hace posible además una factibilidad terapéutica sistémica que concierne a todo el cuerpo para tipos de tumores no sólidos y/o que forman metástasis.

Las nanopartículas y mezclas farmacéuticas acordes con la invención son empleadas para el tratamiento como también para la profilaxis de enfermedades que se distinguen por especies celulares degeneradas o células extrañas al cuerpo y en las cuales las propiedades de las nanopartículas acordes con la invención pueden ser explotadas, para discriminar entre células externas o bien células degeneradas y células corporales saludables. Como células degeneradas valen en particular células cancerosas o bien células con perturbaciones en su proliferación como también tejidos estenóticos o restenóticos. Como células externas al cuerpo pueden mencionarse en particular bacterias.

En consecuencia las nanopartículas acordes con la invención y las mezclas farmacéuticas que contienen nanopartículas son empleadas para la profilaxis y tratamiento de tumores, carcinomas y cáncer.

Como ejemplos de tipos de cáncer y tumores, donde pueden ser empleadas las nanopartículas acordes con la invención, son de mencionar: adenocarcinoma, melanoma coroides, leucemia aguda, neurinoma acústico, carcinoma de ampolla de Vater, carcinoma anal, astrocitoma, basalioma, cáncer de páncreas, tumores en tejido conectivo, cáncer de vejiga, carcinoma bronquial, carcinoma bronquial de células no pequeñas, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma corpus, síndrome de CUP, cáncer de intestino grueso, cáncer de intestino delgado, tumores de intestino delgado, cáncer de ovario, carcinoma del endometrio, ependimoma, tipos de cáncer epitelial, tumores de Ewing, tumores gastrointestinales, cáncer de vesícula biliar, carcinoma biliar, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, tumores ginecológicos, tumores de cuello, nariz y oído, neoplasias hematológicas, leucemia de células del cabello, cáncer de uretra, cáncer de la piel, tumores de cerebro (glioma), metástasis de cerebro, cáncer de testículo, tumor de hipófisis, carcinoide, sarcoma de Kaposi, cáncer de laringe, tumor en células germinales, cáncer de huesos, carcinoma colorectal, tumores del cuello y cabeza (tumores de la región del cuello, nariz y oídos), carcinoma de colon, craneofaringeoma, cáncer en la región de la boca y los labios, cáncer de hígado, metástasis de hígado, leucemia, tumores del párpado, cáncer pulmonar, cáncer de ganglio linfático (Hodgkin/no-Hodgkin), linfoma, cáncer gástrico, melanoma maligno, neoplasma maligno, malignoma del tracto gastrointestinal, carcinoma de mama, cáncer rectal, meduloblastoma, melanoma, meningeoma, Morbus Hodgkin, Mycosis fungoides, cáncer de nariz, neurinoma, neuroblastoma, cáncer renal, carcinomas de células renales, linfoma no-Hodgkin, oligodendroglioma, carcinoma de esófago, carcinoma osteolítico y carcinomas osteoplástico, osteosarcoma, carcinoma de ovarios, carcinoma de páncreas, cáncer de pene, plasmocitoma, carcinoma de las placas del epitelio de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de faringe, carcinoma de un recto, retinoblastoma, cáncer vaginal, carcinoma de tiroides, enfermedad de Schneeberger, cáncer de esófago, espinalioma, linfoma de células T (Mycosis fungoides), timoma, carcinoma de trompa de Falopio, tumores de los ojos, cáncer de uretra, tumores urológicos, carcinoma de urotelio, cáncer de vulva, implicación de verrugas, tumores de partes blandas, sarcoma de partes blandas, tumor de Wilms, carcinoma cervical y cáncer de lengua.

En particular se prefieren los tumores sólidos. Además se prefieren el carcinoma de próstata, tumores cerebrales, sarcoma, carcinoma cervical, carcinoma de ovarios, carcinoma de mama, carcinoma bronquial, melanoma, tumores de cabeza y cuello, carcinoma de esófago, carcinoma rectal, carcinoma de páncreas, vejiga y riñón, metástasis del hígado, del cerebro y en los ganglios linfáticos.

En particular se prefieren además la aplicación y el uso de las nanopartículas acordes con la invención junto con la hipertermia convencional, radioterapia y/o junto con la quimioterapia corriente.

**Ejemplos****Ejemplo 1:**

Producción de nanopartículas con mitomicina acoplada para la liberación:

5 Para el acoplamiento del citostático mitomicina en nanopartícula de óxido de hierro estabilizada con aminosilano se sintetiza primero un conjugado de mitomicina y trietoxisililbutiraldehído. Para ello se disuelven mitomicina y trietoxisililbutiraldehído en la relación molar de 1:1 y se agita por 2 horas. De este modo se acopla el principio activo con un enlace imino al silano. Éste conjugado es empleado entonces de la siguiente manera para el revestimiento de nanopartículas de óxido de hierro: con ácido acético se ajusta a 5 el valor de pH de una suspensión de nanopartículas de óxido de hierro no revestidas (producida a partir de cloruro de hierro (II) y cloruro de hierro (III) mediante precipitación con hidróxido de sodio). Se añade entonces bajo agitación constante una  
10 mezcla del conjugado de mitomicina-silano y aminopropiltriethoxisilano. Se ajusta previamente la relación molar de mitomicina a aminopropiltriethoxisilano a 1:50. Después de 24 horas se añade etilenglicol, de modo que se duplica el volumen de la suspensión. Después se elimina el agua mediante destilación. Mediante ello se acopla fijamente el silano a la partícula de óxido de hierro. Se purifica la suspensión mediante diálisis contra agua ultrapura y se concentra hasta una concentración de hierro de 1 mol/l (por destilación).

**15 Ejemplo 2:**

Acoplamiento de un oligonucleótido modificado con amina con una nanopartícula de óxido de hierro sobre glutaraldehído como molécula de enlace

20 Se producen nanopartículas estabilizadas con aminosilano mediante precipitación de cloruro de hierro (II) y cloruro de hierro (III) con hidróxido de sodio y se la reviste mediante adición de aminopropiltriethoxisilano (según WO 97/38058). Se concentra la suspensión hasta una concentración de hierro de 2 mol/l.

Se lavan 500 µl de la suspensión con 10 ml de tampón PIPES (ácido piperazin-N,N'-bis-2-etanosulfónico; pH = 7,4). Se añade entonces solución al 5 % de glutaraldehído (6ml) y se agita por 2 horas. Se lavan las partículas así activadas y se suspenden nuevamente en 800 µl de tampón PIPES. Se disuelven en agua 0,3 µmol del oligonucleótido modificado con amina (modificación amino terminal) y se añaden. Se agita la suspensión por 12  
25 horas. Después se lavan las partículas con agua ultrapura y se suspenden nuevamente en 500 µl de agua ultrapura.

**Ejemplo 3:**

Aplicación de una capa biológicamente degradable

30 Las nanopartículas producidas según el ejemplo 2 con molécula de enlace glutaralaldehído y después con oligonucleótido inmovilizado, son secadas por congelación y tratadas en el método de atomización con una solución de etanol que contiene poliglicol. Después de la eliminación de solvente se obtienen nanopartículas dotadas con un revestimiento biológicamente degradable de poliglicol. Tales revestimientos sirven para la unión de por ejemplo aptámeros y anticuerpos específicos para células de tumor.

**Ejemplo 4:**

35 Acoplamiento de sustancias activas sobre oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos ocurre hoy de modo más ampliamente automatizado mediante aplicación de una química establecida de grupos protectores. Se acopla un corto oligonucleótido consistente en 15 nucleótidos mediante una modificación terminal de modo covalente a la nanopartícula (ver Ejemplo 2). Un segundo oligonucleótido, complementario por la primera vez, es acoplado mediante una modificación terminal con el principio activo doxorubicina. Ambos componentes son aplicados conjuntamente y se calienta brevemente a 95°C, para desnaturalizar los oligonucleótidos. Mediante incubación subsiguiente a una temperatura que está escasamente bajo el punto de fusión del oligonucleótido, se aparean ambas cuerdas hasta dar una cuerda doble. En ello, se elige la secuencia de oligonucleótidos de modo que bajo condiciones fisiológicas resulta un punto de fusión de aproximadamente 48°C, por consiguiente no es posible la fusión de la doble cuerda. Mediante un calentamiento por encima de 50°C funde cuantitativamente el ADN de cuerda doble resultante y se libera el principio activo junto con el oligonucleótido que une. El ADN de cuerda sencilla es degradado rápidamente, cuando él llega al interior de una célula, de modo que entonces el principio activo es totalmente libre.  
40  
45

**Ejemplo 5:**

Acoplamiento de la sustancia activa sobre triple hélice de ácido nucleico

50 Puede emplearse terapéuticamente ARN de cuerda doble como el denominado siARN (por ARN de pequeña interferencia), para deshabilitar genes específicos. Si debiera liberarse con control externo un ARN así, de la nanopartícula empleada como medio de transporte, el método que se debe elegir es el enlace sobre una hélice triple específica. Un oligonucleótido que une a la doble cuerda que se ajusta al siARN empleado está unido

mediante una modificación terminal del oligonucleótido de modo covalente a la nanopartícula (según el Ejemplo 2). (Mediante ello se hace posible el enlace posterior de un denominado "oligonucleótido que forma triplete" (TFO)). Para alcanzar una estabilidad aumentada respecto a las enzimas hidrolíticas, se emplean en ello oligonucleótidos en los cuales la columna vertebral de azúcar-fosfato ácido nucleico es reemplazada por una columna vertebral sintética de tipo péptido, la cual es análoga estructuralmente al ácido nucleico; en ello, es un denominado péptido-ácido nucleico (PANs). Mediante la hibridación apenas bajo el punto de fusión de la triple hélice objetivo (el cual simultáneamente es inferior al punto de fusión del ARN de doble cuerda), se enlaza el oligonucleótido unido de modo covalente al ARN de doble cuerda en la estría amplia.

Dado que aquí el punto de fusión de 45°C no es alcanzado, bajo condiciones fisiológicas no tiene lugar ninguna liberación digna de mencionarse. Sólo mediante la superación terapéutica del punto de fusión de la hélice triple, funde ésta con liberación del siARN de cuerda doble.

#### **Ejemplo 6:**

Acoplamiento de sustancias activas a una molécula de oligopéptido

En particular, para la focalización de efectores de polipéptidos producidos mediante técnica genética como acaso el factor de necrosis tumoral (TNF alfa) es adecuado el acoplamiento sensible a la temperatura sobre un dominio de oligopéptido sensible a la temperatura. Para esto se emplea una denominada cremallera de leucina que genera heterodímero. La unión es estabilizada y simultáneamente transformada en específica mediante las interacciones iónicas de grupos cargados (arginina/lisina versus glutamato/aspartato).

En las nanopartículas se enlaza de modo covalente un oligopéptido sintético de 22 aminoácidos de la cremallera max-leucina con una modificación terminal del oligopéptido. Por adición de una preparación TNF producida mediante técnica genética, que porta de modo terminal los correspondientes 22 aminoácidos de la cremallera myc-leucina, se une de modo cuantitativo el factor de necrosis tumoral a la nanopartícula. Durante una termoterapia se supera la temperatura de fusión de la cremallera de leucina, de modo que el factor de necrosis tumoral (no comprometido en su función) es liberado localmente.

#### **Ejemplo 7:**

Acoplamiento de sustancias activas sobre puentes de oligonucleótido-péptido

Aparte de las interacciones termolábiles específicas de ácido nucleicos con ácidos nucleicos y de proteínas con proteínas (o bien polipéptidos con polipéptidos) existen así mismo interacciones biológicas específicas (como también no específicas) de proteínas o bien polipéptidos con ácidos nucleicos. Puesto que tales interacciones recaen exactamente en los mismos enlaces no covalentes, básicamente ellas son exactamente tan termolábiles como las mencionadas anteriormente y de allí que se usan exactamente como sistema de molécula de enlace termolábil para la liberación térmica de los principios activos. Se emplean proteínas que interactúan de modo no específico (por ejemplo histonas, o la proteína SSB que se une a cuerda sencilla de la bifurcación de replicación de ADN) o altamente específico con ácidos nucleicos (por ejemplo represores, factores de transcripción). Como polipéptidos que se unen de modo específico a ADN se emplean también los denominados motivos "hélice-giro-hélice" de proteínas-represor así como los denominados motivos de "dedos de zinc" de las proteínas nucleares de receptor. Típicamente ambos incluyen 60 aminoácidos. (Los motivos de dedos de zinc consisten en dos grandes bucles con en cada caso dos pares de cisteínas, o bien un par de cisteínas y un par de histidinas, los cuales están mantenidos juntos sobre en cada caso un átomo de zinc en forma de complejo). Mediante ello surgen dos estructuras del tipo dedo, que están asidas a las grandes estrías del ADN. Entre las dos estructuras está una molécula de enlace que incluye 15 a 20 aminoácidos, que en los receptores de hormonas esteroides contienen una secuencia de aminoácidos que reconoce de modo específico una secuencia de ADN palindrómico.

En la superficie de la nanopartícula está acoplado de modo covalente un oligopéptido sintético de 60 aminoácidos el cual incluye el motivo completo de dedos de zinc del receptor de glucocorticoide. La molécula de principio activo de doxorubicina esta acoplada de modo covalente a un oligonucleótido de cuerda doble de 15 pares de bases, el cual incluye la secuencia de reconocimiento del receptor de glucocorticoide (el así denominado "elemento de respuesta glucocorticoide" GRE). Ambos componentes están acoplados a un complejo que es estable bajo condiciones fisiológicas. Si la nanopartícula se calienta mediante acoplamiento de un campo magnético alternante, se supera la temperatura de fusión del complejo. Mediante la degradación del complejo se libera el conjugado oligonucleótido-principio activo.

#### **Ejemplo 8: acoplamiento de sustancias activas sobre puentes anticuerpo-hapteno**

El enlace espontáneo de un hapteno como agente terapéutico sobre una albúmina propia del cuerpo puede conducir a una reacción inmune. La unión de anticuerpos puede conducir también a una neutralización del efecto activo. Este efecto es empleado para alcanzar una activación local mediante una degradación térmica de los complejos anticuerpo-hapteno.

Los denominados fragmentos Fv (las piezas de escisión de anticuerpos más pequeñas posibles que se unen al antígeno) de un anticuerpo dirigido contra la doxorubicina generados por vía bioquímica (u opcionalmente por vía genética), están unidos de modo covalente a la superficie de las nanopartículas. Las posiciones de enlace del antígeno son saturadas mediante adición de un exceso de doxorubicina. Mediante separación magnética o centrifugación se liberan las nanopartículas saturadas con doxorubicina del principio activo enlazado de modo no específico y dado el caso se lavan adicionalmente.

Después de la administración intravenosa de las nanopartículas saturadas con floxorubicina, éstas circulan de la manera más ampliamente libre de los efectos secundarios comunes del citostático. Se alcanza una concentración no específica de las nanopartículas en la región de los tumores, porque las nanopartículas allí pueden abandonar el depósito a través de las paredes aún permeables del depósito que se forman de modo permanente. Adicionalmente, mediante un revestimiento superficial especial puede provocarse la absorción intracelular en células tumorales (condicionado por la frecuencia de la mitosis) pero no en células benignas. Después de un tiempo medido de la concentración intratumoral, puede causarse un calentamiento de la nanopartícula, mediante campos magnéticos externos; aparte del deterioro del tejido que puede ser causado por la hipertermia, mediante el calentamiento se funde el complejo hapteno-anticuerpo(-fragmento). Debido a su efecto autónomo citotóxico así como el efecto que sensibiliza a la radiación de la doxorubicina, se potencia el efecto de deterioro en los tejidos de la hipertermia. Con ello se alcanza una verdadera sinergia en la lucha contra los tumores.

#### Ejemplo 9: acoplamiento de sustancias activas con puentes de biotina-avidina

El enlace no covalente entre la vitamina biotina y la proteína de enlace avidina de albúmina de huevo de aves de corral (o bien su análoga bacteriana estreptavidina) es la interacción no covalente más fuertemente conocida absolutamente. Respecto a las elevadas energías de enlace, este enlace no puede fundir sin embargo en el intervalo de temperatura disponible. Sin embargo, para poder emplear este enlace altamente específico, tiene que referirse a derivados de la biotina con fuerza reducida de enlace, acaso la destiobiotina (con una constante de disociación de  $5 \times 10^{13}$  frente a  $1 \times 10^{15}$  para la biotina) o la iminobiotina (constante de disociación  $3,5 \times 10^{11}$ ), cuyo enlace a la (estrept-)avidina funde fisiológicamente a temperaturas que pueden ser alcanzadas terapéuticamente.

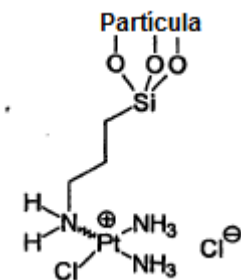
La iminobiotina esta acoplada por su grupo amino con el grupo amino de la doxorubicina; en ello, el enlace es producido mediante el glutardialdehído. El acoplamiento de las nanopartículas con estreptavidina común en el mercado ocurre mediante una función amino del revestimiento superficial así mismo por medio del glutardialdehído. Mediante la adición de un exceso de iminobiotinil-doxorubicina se cargan las nanopartículas con doxorubicina. Estas nanopartículas cargadas con doxorubicina son concentradas de modo pasivo *in vivo* debido a la permeabilidad del endotelio en la región del tumor y adicionalmente son concentradas de modo activo en las células tumorales mediante endocitosis. La hipertermia inducida magnéticamente es fortalecida de manera sinérgica también aquí mediante la liberación térmica del agente de sensibilización doxorubicina.

#### Ejemplo 10:

Producción de nanopartículas con cisplatino acoplado para la liberación:

Para el acoplamiento del citostático cisplatino sobre nanopartícula de óxido de hierro estabilizada con aminosilano, las nanopartículas definidas en el ejemplo 1 son transformadas primero en el derivado por medio de aminopropiltrióxidosilano. Para ello se ajusta con ácido acético a 5 el valor de pH de una suspensión de nanopartículas de óxido de hierro no revestidas (producida a partir de cloruro de hierro (II) y cloruro de hierro (III) mediante precipitación con hidróxido de sodio). El aminopropiltrióxidosilano es añadido gota a gota en relación molar, referida al número teórico máximo de grupos hidroxilo, se agita por una hora a temperatura ambiente y a continuación se reemplaza con una cantidad equimolar de cisplatino, el cual entra en una reacción de sustitución nucleofílica con los grupos amino del silano.

La nanopartícula transformada en derivado obtenida tiene la siguiente estructura:



**Ejemplo 11: acción de la nanopartícula de cisplatino según el ejemplo 10 sobre células de glioblastoma**

Se probó una solución acuosa de esta nanopartícula de cisplatino en comparación con las nanopartículas no transformadas en derivado, en células de glioblastoma.

- 5 Las pruebas *in-vitro* fueron realizadas con la línea de células humanas de glioblastoma RUSIRS1 (tumor cerebral). Se tomaron del tejido de tumor de un paciente, las células de glioblastoma como se describe en DE 199 12 798 C1, y se cultivaron. Para probar la eficacia de las nanopartículas de cisplatino se colocaron en cada caso  $2 \times 10^6$  células RUSIRS1 en un recipiente para cultivo celular de  $75 \text{ cm}^3$  con 25 ml de cultivo celular (D-MEM + 20% FBS + 1,2 ml piruvato). Se distribuyó la suspensión celular simultáneamente en 4 recipientes de cultivo. A dos de estas suspensiones celulares se añadieron en cada caso 153  $\mu\text{l}$  de solución acuosa de esta nanopartícula de cisplatino (cFe = 2 mol/l). Los otros dos frascos de cultivo sirvieron como referencia y se añadieron allí 153  $\mu\text{l}$  de solución acuosa de nanopartículas (cFe = 2 mol/l) no transformadas en derivado. Las muestras de la nanopartícula fueron calentadas por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  antes de la adición a las células y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la adición de las nanopartículas se dejaron reposar las muestras por 1 h y después de eso se sometió a un tratamiento por 30 minutos mediante un campo magnético alternante. Se repitió este tratamiento después de 24 horas. Ya después de un tiempo de incubación de 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  se manifestó en las dos muestras con nanopartículas de cisplatino un deterioro ya claramente marcado comparado con las dos muestras de las nanopartículas no transformadas en derivado.

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula, donde a la nanopartícula se enlaza por lo menos una sustancia terapéuticamente activa mediante una molécula de enlace, donde la molécula de enlace contiene un grupo termolábil, electromagnéticamente lábil, fotolábil, lábil al ácido, que puede estar intercalado o que puede ser escindido enzimáticamente y donde la molécula de enlace es una molécula de ácido nucleico, un polipéptido, un péptido-ácido nucleico, un aptámero, ADN, ARN, una cremallera de leucina, un oligonucleótido, un oligopéptido, un puente de hapteno-anticuerpo o un puente de biotina-avidina, o donde en la molécula de enlace está presente una unión de biotina a avidina o a estreptavidina, y donde el desprendimiento de la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa de la nanopartícula es provocado o iniciado o esencialmente elevado mediante un campo magnético alternante.
- 5 2. Nanopartícula según la reivindicación 1, donde la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa está enlazada de modo covalente a la nanopartícula.
3. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde la molécula de ácido nucleico es un fragmento de ácido nucleico de doble cuerda, una hélice doble, un homo-o hetero-híbrido de ADN-ADN, ADN-ARN, ADN-APN, ARN-ARN, ARN-APN o APN-APN.
- 15 4. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde la nanopartícula está provista de una envoltura protectora o un revestimiento.
5. Nanopartícula según la reivindicación 4, donde la envoltura protectora o el revestimiento exhiben grupos amino o grupos carboxi.
- 20 6. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa es elegida de entre el grupo que incluye principios activos anti-proliferativos, anti-migratorios, antiangiogénicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, antiflogísticos, citostáticos, citotóxicos, anti-coagulantes, anti-bacterianos, anti-virales y/o anti-micóticos.
7. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa es elegida de entre el grupo que incluye actinomicina D, ametantrona, 9-aminocamptotecina, aminoglucetimidina, amsacrina, anastrozol, antagonistas de bases de purina y pirimidina, antraciclinas, inhibidores de aromatasas, asparaginasa, antiestrogénicos, bendamustina, bexaroten, bioluminiscencia A9, bleomicina, buselerina, busulfan, calicheamicina, camptotecina, derivados de camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, citosinarabinósido, citostáticos que añaden grupos alquilo, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, 5'-desoxi-5-fluorouridina, docetaxel, doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo, epirubicina, estramustina, etopósido, exemestano, fludarabina, fluorouracilo, antagonistas de ácido fólico, formestano, gemcitabina, glucocorticoides, goserlina, hormonas y antagonistas de hormonas, hicamtina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, irinotecano, letrozol, leuprorelina, lomustina, maitansinoides, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, miltefosina, mitomicina, mitopozide, inhibidores de mitosis, mitoxantrón, nimustina, oxaliplatino, oxazafosforina, paclitaxel, pentostatina, derivados de podofilotoxina, procarbazona, rapamicina, rodomicina D, tamoxifen, temozolomida, tenipósido, testolactona, tiotepa, tioguanina, inhibidores de topoisomerasa, topotecan, treosulfan, tretinoína, triptorelina, trofosfamida, alcaloides vinca, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, antibióticos activos citostáticos.
- 25 8. Nanopartícula según la reivindicación 6, donde la por lo menos una sustancia terapéuticamente activa es elegida de entre el grupo que incluye ácidos nucleicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, glicoproteínas, glicanos o lipoproteínas, donde las sustancias anteriores poseen propiedades anti-proliferativas, anti-migratorias, antiangiogénicas, antitrombóticas, antiinflamatorias, antiflogísticas, citostáticas, citotóxicas, anti-coagulantes, anti-bacterianas, anti-virales y/o anti-micóticas.
- 40 9. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde la nanopartícula consiste en óxidos de hierro superparamagnéticos o en hierro puro con una capa de óxido.
- 45 10. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde a la nanopartícula está enlazado un agente que genera sensibilidad, un agente que genera radiosensibilidad y/o un potenciador para reforzar los métodos convencionales de tratamiento del cáncer.
11. Nanopartícula según una de las reivindicaciones precedentes, donde a la superficie de la nanopartícula están acoplados anticuerpos monoclonales o bien fragmentos de anticuerpos y/o aptámeros.
- 50 12. Solución de infusión que contiene nanopartículas según una de las reivindicaciones 1 - 11.
13. Empleo de las nanopartículas según una de las reivindicaciones 1 - 11 para la producción de una mezcla farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades proliferativas, cáncer e infecciones bacterianas.