(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 483 124**

(51) Int. CI.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11159810 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2508171**

(54) Título: **Composición farmacéutica de nanopartículas magnéticas**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSITÄTSKLINIKUM ERLANGEN (50.0%)
Maximiliansplatz 2
91054 Erlangen, DE y
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT ERLANGEN-NÜRNBERG (50.0%)

(72) Inventor/es:

SCHREIBER, EVELINE;
TIETZE, RAINER;
ALEXIOU, CHRISTOPH y
LYER, STEFAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Composición farmacéutica de nanopartículas magnéticas

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas magnéticas para la orientación magnética de fármacos. La invención se refiere además a la utilización de dicha composición farmacéutica como medicamento y concretamente para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante la orientación magnética de fármacos utilizando un campo magnético externo. La presente invención se refiere además a un método para preparar dicha composición farmacéutica.

Antecedentes de la técnica

La terapia de las enfermedades depende en gran medida de la selectividad de un agente terapéutico y, por lo tanto, es un equilibrio entre la eficacia y la toxicidad de cada agente terapéutico. Lo anterior se refiere concretamente a terapias que utilizan agentes terapéuticos que necesitan administrarse en áreas regionales y locales de un sujeto y todavía más en el caso de que el agente presente una toxicidad elevada, tal como los quimioterapéuticos.

Por lo tanto, en el caso de una enfermedad regional o local existe una necesidad de administrar agentes terapéuticos y/o de imagen de manera selectiva en las áreas de enfermedad regionales o locales. De esta manera, dicha administración selectiva puede reducir la dosis sistémica de un agente terapéutico con el fin de reducir o evitar efectos secundarios. Por lo tanto, se requieren sistemas de portador de fármaco que resulten adecuados para administrar selectivamente un agente terapéutico en un tejido diana de un sujeto. También se requieren agentes de imagen para identificar una enfermedad local y para controlar el éxito de una terapia local, permitiendo de esta manera reducir adicionalmente la dosis de un agente terapéutico. De acuerdo con lo anterior, existe una demanda de reducción de los efectos secundarios causados por la terapia sistémica, incrementando simultáneamente la eficacia de la terapia al aprovechar un sistema portador de fármaco adecuado para la terapia regional o local, preferentemente acompañada del seguimiento del inicio y progreso de la terapia.

Se han descrito diversas composiciones de nanopartículas magnéticas para la terapia y seguimiento dirigido. Además, se han descrito diferentes recubrimientos biocompatibles para las nanopartículas magnéticas, incluyendo biopolímeros tales como dextrano y almidón, recubrimientos de resina, tales como poliestireno y polietilenglicol (PEG), así como recubrimientos inorgánicos, tales como oro, sílice o alúmina. Además, se han descrito composiciones de nanopartículas que se utilizan para portar un fármaco y que presentan recubrimientos biopolímero que pueden unirse a determinados fármacos mediante unión covalente o unión iónica mediante grupos funcionales iónicos del biopolímero.

Sin embargo, las composiciones de nanopartículas de la técnica anterior presentan determinadas desventajas. Por ejemplo, las composiciones conocidas pueden requerir una síntesis laboriosa, son caros o se encuentran limitados a un campo de aplicación específico. En el caso de que actúen como portador de un fármaco o agente de imagen, las nanopartículas de la técnica anterior pueden presentar recubrimientos que no satisfacen las elevadas exigencias, por ejemplo de estabilidad, capacidad de carga y esterilidad. En la actualidad no se dispone de ninguna composición de nanopartículas recubiertas que pueda utilizarse convenientemente para diversos campos de aplicación sin laboriosas modificaciones individualizadas, que satisfaga simultáneamente las elevadas exigencias respecto a características tales como la estabilidad, la capacidad de carga y la esterilidad de la composición.

El documento nº US 2010/303730 (A1) se refiere a un método de preparación de nanopartículas que contienen hierro que incluye poner en contacto un precursor que contiene hierro con un agente reductor a una temperatura inferior a 200ºC y permitir que la mezcla reaccione formando nanopartículas de magnetita. Las nanopartículas pueden modificarse en superficie con surfactantes y/o agentes de terminación de cadena, tales como PEG y ácido oleico, y formar dispersiones estables en medios no acuosos.

R. Zboril et al. ("One-step solid state synthesis of capped γ-Fe_2O_3 nanocrystallites", Nanotechnology, vol. 19, nº 9, 05.02.2008) describen la síntesis de estado sólido de maghemita soluble en la reacción con un ácido alifático, tal como ácido palmítico, ácido láurico u oleilamina, conduciendo a que el producto resulte soluble en muchos solventes orgánicos o dispersables en solventes organofílicos.

El documento nº WO 2010/134087 (A1) se refiere a una formulación acuosa de nanopartículas magnéticas dispersables en la que las nanopartículas están compuestas de un núcleo de óxido de hierro recubierto con el lípido polimérico de cadena larga monooleato de glicerilo, que proporciona dispersibilidad acuosa sin utilización de surfactante.

El documento nº EP 0971692 (A2) se refiere a magnetosomas específicos que consisten de un monocristal de óxido de hierro magnético magnetita y una membrana de fosfolípico que circunda dicho cristal.

T.K. Jain et al. (Biomaterials, Volumen 29, número 29, octubre 2008, páginas 4012 a 4021) describe nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido oleico de óxido de hierro y estabilizadas con plurónico para la administración de fármaco y propiedades de obtención de imágenes de resonancia magnética.

El documento nº WO 02/43708 (A2) se refiere a partículas magnéticas que comprenden una sustancia magnética combinada con una sustancia terapéutica. Las partículas están recubiertas con polímeros de almidón modificados con grupo fosfato y se une mitoxantrona a los grupos fosfato mediante interacción iónica reversible. Las partículas se utilizan para la magnetoterapia regional de enfermedades mediante la aplicación intraarterial.

C. Alexiou et al. (European Biophysics Journal, mayo de 2006, volumen 35, número 5, páginas 446 a 450) describen la orientación magnética de fármacos utilizando nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con derivados de almidón con grupso fosfato que se unen a mitoxantrona como quimioterapéutico.

S. Lyer et al. ("Visualisation of tumour regression after local chemotherapy with magnetic nanoparticles -A pilot study", ANTICANCER RESEARCH, vol. 30, nº 5, páginas 1553 a 1557) se refieren a la visualización de la vascularización y tamaño tumoral mediante DYNA-CT, que proporciona información aplicable a la orientación magnética de fármacos.

B. Mishra et al. (Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, volumen 6, número 1, páginas 9 a 24) revisa nanoportadores coloidales con respecto a aspectos de formulación, tipos y orientación específica de sitio de fármacos utilizando diversas formas de nanoportadores coloidales con especial relación con el campo de la oncología. Los enfoques nanotecnológicos especializados, como los puntos cuánticos, dendrímeros, integrinas, anticuerpos monoclonales, que han sido investigados ampliamente para la administración dirigida de agentes terapéuticos y diagnósticos, también se comentan. M. V. Avdeev ("Structure and in Vitro Biological Testing of Water-Based Ferrofluids Stabilized by Monocarboxylic Acids", Langmuir 26(11):8503-8509, 2010) describe ferrofluidos de base acuosa con estabilización estérica de doble capa con los ácidos láurico y mirístico.

J. Giri et al. ("Synthesis and characterizations of water-based ferrofluids of substituted ferrites [$Fe_{1-x}B_xFe_2O_4$, B=Mn, Co (x=0-1)] for biomedical applications", JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, vol. 320, nº 5, páginas 724 a 730, 2008) describen ferrofluidos que presentan nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido láurico.

R. Regmi et al. (J. Appl. Phys 106:113902, 2009) describen nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 que presentan diámetros de aproximadamente 12 nm, que se recubrieron con tres surfactantes ácidos grasos diferentes: ácido oleico, ácido láurico y ácido mirístico, que se disolvieron en ciclohexano para estudios de la magnetohidrodinámica.

P. Pradhan et al. (Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Vol. 311, número 1, páginas 282 a 287, 2007) describe la citocompatibilidad in vitro e interacciones celulares de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido láurico y dextrano, que fueron evaluadas con dos líneas celulares diferentes (carcinoma de fibroblastos de ratón y cervical humano). Las nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido láurico eran menos citocompatibles que las nanopartículas de magnetita recubiertas con dextrano y la incorporación celular de las nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido láurico era superior a la de las nanopartículas de magnetita recubiertas con dextrano.

R. Tietze et al. (J. Biomed. Biotechnol., vol. 50, nº 11-12, 1 de enero de 2010, páginas 705 a 709) describe un método analítico (HPLC-UV) para detectar mitoxantrona pura o unida a ferrofluido en una matriz compleja incluso en cantidades residuales con el fin de llevar a cabo estudios de distribución biológica.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se ha llevado a cabo a la luz de las circunstancias anteriormente indicadas y un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica económica, fácilmente accesible y eficiente que comprende nanopartículas recubiertas, que se utiliz como portador para fármacos de una manera sencilla. La composición farmacéutica presente el beneficio de que puede modificarse fácilmente y de manera altamente eficiente con un agente terapéutico bajo condiciones estandarizadas de manera que resulte adecuada para la terapia mediante la orientación magnética. Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un método para preparar dicha composición farmacéutica.

Los objetivos de la presente invención se alcanzan mediante los ítems siguientes referentes a la materia objeto de la invención e incluyendo modificaciones particularmente eficientes:

1. Composición farmacéutica para la orientación magnética, comprendiendo la composición nanopartículas magnéticas, un medio de dispersión acuoso que presenta un contenido de sólidos de entre 8 y 25 mg/ml,

comprendiendo las partículas un núcleo de partícula magnética y un recubrimiento que comprende un ácido graso, en el que el ácido graso es ácido láurico y en el que los núcleos de las partículas se recubren con 25 a 45 partes en peso del ácido graso respecto a 100 partes en peso del núcleo de la partícula, en el que el núcleo de las partículas es un óxido de hierro, preferentemente Fe_2O_3/Fe_3O_4 monodominio y multidominio y en el que las partículas magnéticas comprenden además mitoxantrona, que se adhiere directamente sobre la superficie de los núcleos de las partículas y/o en el interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática.

2. Composición farmacéutica según el ítem 1, en la que los núcleos de las partículas se recubren con 25 a 35 partes en peso del ácido graso respecto a 100 partes en peso de núcleo de partícula.

3. Composición farmacéutica según el ítem 1 ó 2, en la que las partículas magnéticas presentan un potencial zeta en un medio de dispersión acuoso de entre -15 y -45 mV, preferentemente de entre -20 y -35 mV.

4. Composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 1 a 3, en la que las partículas se cargan con mitoxantrona, por lo menos con 0,1 partes en peso, preferentemente por lo menos 1 parte en peso, particularmente preferentemente por lo menos 2 partes en peso, respecto a 100 partes en peso de núcleo de partícula.

5. Composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 1 a 4, en la que las partículas magnéticas presentan un tamaño de partícula inferior a 220 nm, preferentemente inferior a 180 nm, medido mediante dispersión hidrodinámica de láser en un estado monodispersado o multidispersado en un medio acuoso.

6. Composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 1 a 5 para la utilización como medicamento.

7. Composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 1 a 5, para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante la orientación magnética de fármacos utilizando un campo magnético externo.

8. Composición farmacéutica para la utilizción según el ítem 7, en la que la composición se administra intraarterialmente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

9. Composición farmacéutica para la utilización según el ítem 7 ó 8, en la que el posicionamiento y la vascularización del tejido diana y el posicionamiento para acceder al sistema arterial se determinan a partir de imágenes angiográficas, opcionalmente mediante Dyna-CT.

10. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de los ítems 7 a 9, en la que la cantidad de la composición farmacéutica que debe administrarse se ajusta mediante el seguimiento en línea del tejido diana y/o en la que la composición se administra de una vez o mediante la administración repetida, preferentemente tras el seguimiento angiográfico y basado en MRT.

11. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de los ítems 7 a 10, en la que la composición farmacéutica se guía al tejido diana y se acumula en el mismo mediante la aplicación de un gradiente de campo magnético externo, preferentemente que presenta una densidad de flujo magnético elevada, de entre 0,5 y 1,5 T, y un gradiente de campo magnético de entre 10 y 90 T/m.

12. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de los ítems 7 a 11, en la que el campo magnético es un campo magnético multidireccional que es espacialmente variable, preferentemente mediante diferentes zapatas de los polos.

13. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 1 a 12, comprendiendo el método por lo menos las etapas siguientes:

- producir nanopartículas magnéticas de óxido de hierro a modo de dichos núcleos de partícula,
- recubrir dichos núcleos de partícula con ácido láurico por lo menos una vez, y
- cargar mitoxantrona sobre la superficie de los núcleos de partícula y/o en el interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática.

14. Método para preparar una composición farmacéutica según el ítem 13, en el que las nanopartículas son partículas de óxido de hierro que se precipitan en una solución acuosa que contiene sales de hierro (II) y de hierro (III) mediante la adición de una base.

15. Método para preparar una composición farmacéutica según el ítem 14, en el que las sales de hierro (II) y de hierro (III) son cloruros o sulfatos de hierro, preferentemente en una proporción molar de 2:3.

16. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 13 a 15, en el que los núcleos de nanopartícula magnética se recubren con ácido láurico a una temperatura elevada, de 60ºC o más, preferentemente de 90ºC o más, preferentemente en una suspensión acuosa.

17. Método para preparar una composición farmacéutica según el ítem 16, en el que la temperatura elevada se mantiene constante durante un tiempo predeterminado, seguido de un enfriamiento lento.

18. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 13 a 17, en el que el método comprende además una etapa de autoclavado de la composición.

19. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de los ítems 13 a 18, en el que el método comprende además la etapa de separar las nanopartículas de manera que se eliminen las partículas y/o aglomerados de partículas con un tamaño de 220 nm o más, preferentemente de 180 nm o más.

Descripción de los dibujos

La fig. 1 es una ilustración esquemática de un ejemplo de síntesis de composición de nanopartículas que incluye la funcionalización con un agente, por ejemplo mitoxantrona (MTO).

La fig. 2 es un diagrama que muestra el tamaño de partícula y distribución de tamaños de partícula medida mediante dispersión hidrodinámica de láser de una composición de nanopartículas de óxido de hierro según la invención que se encuentra recubierta con ácido graso y cargada con el citostático mitoxantrona.

La fig. 2a se refiere a la muestra no filtrada y la fig. 2b se refiere a las muestras filtradas con un filtro de 0,8 µm y un filtro de 0,22 µm.

La fig. 3 es una fotografía de TEM de una composición de nanopartículas de óxido de hierro según la invención que se encuentra recubierta con un ácido graso y cargada con el citostático mitoxantrona.

La fig. 4 ilustra una medición de XPS que verifica que el agente terapéutico (mitoxantrona) se encuentra unido directamente a la superficie de los núcleos de partícula mediante un átomo de nitrógeno mediante interacción electrostática.

La fig. 5 ilutra las curvas de medición DRIFT obtenidas de nanopartículas en bruto (5a), nanopartículas recubiertas con ácido láurico (5b) y nanopartículas recubiertas con ácido graso y funcionalizadas con mitoxantrona (5c). Las mediciones de DRIFT verifican que el ácido graso se encuentra unido covalentemente al núcleo de las partículas.

La fig. 6 ilustra esquemáticamente una nanopartícula (6a) según la invención, que comprende un núcleo de partícula (6b) con un momento magnético (6e) que presenta un recubrimiento que comprende un ácido graso (6c) y en el que un agente terapéutico (6d, por ejemplo mitoxantrona) se encuentra adherido a la superficie del núcleo de la partícula magnética mediante interacción electrostática (6f).

La fig. 7 ilustra esquemáticamente el concepto de orientación magnética de fármaco que aprovecha las nanopartículas (6a) según la invención. La composición de nanopartículas (6a) se administra en el tejido tumoral (7a) del paciente (7f) por una arteria (7b). La composición se guía al tejido tumoral (7a) y se acumula en el mismo mediante un campo de gradiente magnético (7e) generado a partir de la zapata de polo magnético (7c) de un imán (7d).

La fig. 8 ilustra una acumulación de la composición de nanopartículas según la invención en diferentes segmentos de arteria de un modelo de arteria bajo la aplicación de un gradiente magnético de 16 T/m en la zapata de un polo. La fig. 8a ilustra una medición de magnetorelaxometría (MRX) (SQUID) de la cantidad de partículas de óxido de hierro. La fig. 8b ilustra una medición de HPLC del agente terapéutico mitoxantrona unido a las partículas.

La fig. 9 ilustra la distribución biológica de la MTO (fig. 9A) y del óxido de hierro (fig. 9B) en el hígado y en los riñones en un modelo animal tras la aplicación intravenosa. La fig. 9A (diagrama izquierdo) se refiere a una aplicación intravenosa (i.v.) de MTO pura (2,4 a 2,9 mg de MTO pura, n=6) seguida mediante HPLC; la fig. 9A (diagrama derecho) se refiere a una aplicación i.v. de MTO unida a las nanopartículas según la invención que contenían 0,26 a 0,28 mg de MTO (n=5) seguidas mediante HPLC; la fig. 9B se refiere al seguimiento correspondiente mediante mediciones MRX (SQUID) de la cantidad de hierro Fe_3O_4 en el tejido tras la aplicación i.v. de suspensiones de nanopartículas que contenían 0,26 a 0,28 mg de MTO y 7,5 a 8 mg de óxido de hierro, respectivamente (n=5).

La fig. 10 se refiere a imágenes angiográficas que ilustran la aparición y progresión de la remisión tumoral tras la orientación magnética intraarterial (OMI) de fármaco según la invención, en la que la evaluación se lleva a cabo mediante tecnología de obtención de imágenes Dyna-CT. Figs. 11A y C: Dyna-CT antes de la OMI. Figs. 11B y D: 7 semanas (animal A, fig. 11B) y 5 semanas (animal B, fig. D) tras la OMI. Las flechas (i) indican el tejido tumoral. Las flechas (ii) indican la arteria femoral con (figs. 11A y C) y sin (figs. 11B y D) vasos tumorales.

Descripción detallada de la invención

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para la orientación magnética según la reivindicación 1, en la que la composición comprende nanopartículas magnéticas, que

comprende un núcleo de partícula magnético de óxido de hierro y un recubrimiento que comprende el ácido graso ácido láurico.

Debido a que la composición farmacéutica de la presente invención comprende nanopartículas magnéticas que pueden guiarse a un área local predeterminada y acumularse en la misma de un sujeto mediante la aplicación de un campo magnético externo (orientación magnética), no existe necesidad de modificar individualmente las nanopartículas de la composición farmacéutica de la presente invención con un medio selectivo de orientación celular para cada enfermedad que debe tratarse o captarse en imágenes. Por lo tanto, la composición farmacéutica según la presente invención permite aplicación terapéutica porque la composición farmacéutica cargada con el agente terapéutico mitoxantrona puede administrarse en un área de tratamiento regional o local deseada debido a la guía externa por un campo magnético.

La expresión "nanopartícula magnética" utilizada en la presente invención no se encuentra limitada a uan constitución que comprende un único núcleo de partícula magnético sino que comprende también un aglomerado de dichos núcleos de partícula.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las nanopartículas magnéticas comprendidas en la composición farmacéutica de la presente invención comprenden un recubrimiento sobre el núcleo de las partículas y sobre un agregado de núcleos de partículas. Dicho recubrimiento resulta indispensable para las aplicaciones in vivo de las nanopartículas magnéticas debido a que estabiliza las nanopartículas, evita la formación de agregados de mayor tamaño, mejorando simultáneamente su biocompatibilidad.

Los presentes inventores han encontrado que concretamente un recubrimiento que comprende un ácido graso no sólo estabiliza las nanopartículas y evita la formación de agregados de mayor tamaño sino que, además, dicho recubrimiento garantiza además que un agente (un agente terapéutico, un agente de obtención de imágenes o una mezcla de los mismos) puede adherirse directamente a la superficie de los núcleos de partícula y/o al interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática en un procedimiento sencillo en una cantidad de carga elevada y de una manera muy estable. Por lo tanto, según la invención, no existe ninguna necesidad de ningún recubrimiento biocompatible adicional sobre los núcleos de partícula además del recubrimiento que comprende el ácido graso.

En la presente invención, las moléculas de ácido graso anteriormente indicadas se unen a los núcleos de las partículas mediante unión covalente, tal como confirman las mediciones de DRIFT. Por lo tanto, esencialmente la totalidad de las moléculas de ácido graso se encuentra unida covalentemente a los núcleos de las partículas. Sin embargo, también resulta posible que no todas las moléculas de ácido graso se unan covalentemente al núcleo de las partículas. En este caso, puede asociarse una parte menor de las moléculas de ácido graso al núcleo de las partículas de una manera no covalente. Las moléculas de ácido graso que no se encuentran unidas covalentemente al núcleo de las partículas también contribuyen a la estabilización de un estado disperso de la composición farmacéutica. Se considera que el ácido graso asociado no covalentemente actúa como dispersante que estabiliza el estado de dispersión de la composición farmacéutica. La cantidad de moléculas de ácido graso que no se encuentra unida covalentemente a los núcleos de las partículas puede ser de hasta 40%, preferentemente no superior a 30%, más preferentemente no superior a 25%, respecto a la cantidad total de ácido graso comprendida en el recubrimiento.

En contraste con un recubrimiento de polímero, tal como un recubrimiento de resina, un recubrimiento de almidón o un recubrimiento de dextrano, un recubrimiento que comprende un ácido graso no cubre la totalidad de la superficie del núcleo de la partícula o la práctica totalidad de la superficie del núcleo de la partícula, sino que, por el contrario, garantiza que un agente pueda acceder a la superficie del núcleo de la partícula y al interior de un agregado de núcleos de partícula. Por lo tanto, el recubrimiento de la presente invención puede comprender opcionalmente otras moléculas, compuestos y materiales, destinados a mejorar adicionalmente la estabilidad, propiedad, función o especificidad. Puede ser una molécula que garantice o mejore la biocompatibilidad de la nanopartícula, o una molécula que evite que la nanopartícula resulte atrapada por el sistema inmunológico. Sin embargo, dichos constituyentes adicionales en el recubrimiento sólo son opcionalmente y pueden encontrarse presentes únicamente en una cantidad a condición de que el agente terapéutico pueda adherirse directamente a la superficie del núcleo de la partícula y al interior de un agregado de núcleos de partícula.

Los inventores inesperadamente han encontrado que, aunque el recubrimiento de ácido graso según la invención garantiza que el agente anteriormente indicado acceda a la superficie del núcleo de la partícula, al contrario que los recubrimientos de polímero conocidos, el recubrimiento que comprende el ácido graso también garantiza que el agente anteriormente indicado pueda adherirse a la superficie del núcleo de partícula y al interior de un agregado de núcleos de partícula en una cantidad elevada y de una manera muy estable.

Se cree que la adherencia es tan fuerte porque los agregados de núcleos de partícula necesitan desintegrarse por lo menos parcialmente para liberar el agente adherido a los mismos. Por otra parte, se cree que el ácido graso

presenta cierto "efecto de escudo" que evita que el agente resulte liberado de la superficie del núcleo. Ello podría deberse al hecho de que el agente no se encuentra directamente expuesto a la superficie del recubrimiento sino que se adhiere a la superficie del núcleo de la partícula. Por lo tanto, se considera que el ácido graso forma una estructura de capa que separa y protege el agente que se encuentra adherido directamente a la superficie del núcleo de partícula frente al ambiente circundante, tal como un medio acuoso presente bajo condiciones fisiológicas.

Además, los inventores han encontrado que el recubrimiento que comprende el ácido graso es estable incluso bajo condiciones de autoclavado. En otras palabras, la composición farmacéutica de la presente invención es autoclavable sin modificar sus atributos característicos, tales como el tamaño, la capacidad de carga con el agente y la estabilidad de las nanopartículas recubiertas de la invención. Por lo tanto, la presente invención describe por primera vez una composición de nanopartículas que es aplicable bajo condiciones clínicas ya que puede obtenerse de una manera estéril y estable. La esterilidad de la composición farmacéutica tras el autoclavado se confirmó mediante el método estándar de determinación de endotoxinas, que puso de manifiesto que la composición estable era estéril incluso 14 días después de la incubación.

Por lo tanto, según una realización de la presente invención, el recubrimiento de los núcleos de partícula consiste esencialmente del ácido graso en el sentido de que se garantiza que el agente puede adherirse directamente a la superficie del núcleo de partícula mediante interacción electrostática. De acuerdo con lo anterior, los polímeros voluminosos que cubren la superficie del núcleo de partícula pueden no estar comprendidos en dicho recubrimiento. Tal como se ha indicado anteriormente, los constituyentes adicionales diferentes del ácido graso son sólo opcionales y no deben encontrarse comprendidos en el recubrimiento si dificultan alcanzar los efectos beneficiosos anteriormente indicados de la composición farmacéutica según la invención.

Según una realización, el recubrimiento de los núcleos de partícula consiste preferentemente del ácido graso. Aparentemente, dicha realización presenta el beneficio de ser accesible de manera sencilla sin necesidad de modificaciones adicionales.

Además, el material magnético que constituye el núcleo de partícula es farmacológicamente aceptable, puede recubrirse con el ácido graso y es capaz de adherirse al agente anteriormente indicado mediante interacción electrostática. El material para formar el núcleo de partícula es un óxido de hierro, que puede ser ferromagnético, ferrimagnético o super-paramagnético. Puede ser un material monodominio o multidominio. Preferentemente es un material mixto monodominio y multidominio. Entre los ejemplos se incluyen compuestos tales como MO-Fe_2O_3 y M-Fe_2O_4, en los que M puede estar representado por Mg, Al, Si, Ca, Sc, Ti, V, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Zr, Nb, Mo, Sn, Ba o Li. solos o en combinación. Preferentemente, las partículas de núcleo magnético pueden ser de Fe_2O_3 y/o de Fe_3O_4.

En particular, un núcleo de óxido de hierro mixto monodominio y multidominio Fe_2O_3/Fe_3O_4 muestra una elevada capacidad de respuesta y propiedades de acumulación en las aplicaciones de orientación magnética y, por lo tanto, representa una realización preferente de la presente invención.

El ácido graso comprendido en el recubrimiento de la composición farmacéutica de la presente invención es ácido láurico con el fin de conseguir los mejores resultados referentes a la estabilidad del estado de dispersión de la composición farmacéutica, de la capacidad de carga con un agente y de la estabilidad de la adherencia de dicho agente a la superficie del núcleo de las partículas.

Según una realización específicamente preferente, la composición farmacéutica comprende los núcleos de partícula de Fe_2O_3/Fe_3O_4 anteriormente indicados, recubiertos con ácido láurico. Dicha realización es accesible de una manera sencilla y proporciona características magnéticas y de carga favorables.

Según la invención, los núcleos de las partículas anteriormente indicados se recubren con 25 a 45 partes en peso del ácido graso anteriormente indicado respecto a 100 partes en peso de núcleo de partícula. Con el fin de equilibrar la capacidad de carga y la estabilidad de la carga resulta preferente recubrir los núcleos de las partículas con 25 a 35 partes en peso del ácido graso por cada 100 partes en peso de núcleo de las partículas.

La composición farmacéutica de la invención preferentemente presenta un potencial Zeta en un medio de dispersión acuoso de entre -15 y -45 mV. Con un potencial Zeta comprendido dentro de dicho intervalo, resulta estabilizado el estado de dispersión de la composición farmacéutica según la invención. Este efecto resulta todavía más mejorado para las partículas magnéticas anteriormente indicadas que muestran un potencial Zeta comprendido en el intervalo de entre -20 y -35 mV.

La composición farmacéutica de nanopartículas puede funcionalizarse con un agente de una manera sencilla. En cualquier caso, resulta esencial para la presente invención que los núcleos de partícula comprendan el recubrimiento de ácido graso, ya que de otro modo no puede conseguirse una adherencia estable del agente en una cantidad suficiente.

Las partículas magnéticas anteriormente indicadas comprenden además el agente mitoxantrona, que se adhiere directamente a la superficie del núcleo de las partículas y al interior de los agregados de núcleos de partícula mediante interacción electrostática. Desde el punto de vista de garantizar la adherencia mediante interacción electrostática de una manera estable en una cantidad elevada, dicho agente está constituido de un esqueleto aromático que comprende por lo menos un heteroátomo.

Según una realización específicamente eficiente, tal como se ilustra en la fig. 6, la composición farmacéutica comprende los núcleos de partícula de Fe_2O_3/Fe_3O_4 anteriormente indicados, que se encuentran recubiertos con ácido láurico y en los que se adhiere mitoxantrona a la superficie de los núcleos de las partículas.

Según la invención, el agente anteriormente indicado preferentemente se carga con una cantidad de por lo menos 0,1 partes en peso por cada 100 partes en peso de núcleo de partícula. Más eficientemente, las partículas se cargan con por lo menos 1 parte en peso y más preferentemente con por lo menos 2 partes en peso del agente por cada 100 partes en peso de núcleo de partícula. Resulta preferente cargar el máximo de agente en los núcleos de las partículas con el fin de reducir la cantidad total de composición farmacéutica que debe administrarse.

La composición farmacéutica de la invención comprende además un medio de dispersión que forma un denominado ferrofluido. Dicho medio es un medio acuoso. Dicho medio acuoso puede incluir agente tamponador, sales y dispersantes bajo la premisa de que dichos constituyentes son farmacéuticamente aceptables. Al proporcionarse en forma de un ferrofluido, la composición farmacéutica de la invención puede administrarse muy eficientemente y resulta bien tolerada.

La dispersión presenta un contenido de sólidos de entre 8 y 25 mg/ml. Un contenido de sólidos en el intervalo anteriormente indicado resulta bien tolerado por un sujeto bajo tratamiento con la composición.

La composición farmacéutica preferentemente comprende partículas magnéticas con un tamaño de partícula inferior a 220 nm según medición mediante dispersión hidrodinámica de láser en un estado monodisperso o multidisperso en un medio acuoso. En el caso de que el tamaño de partícula sea superior a 220 nm, existe el peligro de que las partículas se acumulen en el hígado y el bazo, y se evita la formación de agregados de mayor tamaño que conducen a la embolización. Resulta preferente que las partículas magnéticas presenten un tamaño de partícula inferior a 180 nm, o incluso inferior a 140 nm. Al mostrar un tamaño de partícula inferior a dichos intervalos, las partículas magnéticas de la presente invención presentan propiedades de difusión en el tejido adicionalmente mejoradas. Por otra parte, resulta preferente que las partículas magnéticas de la composición presenten un tamaño de partícula de por lo menos 5 nm, preferentemente superior a 10 nm, con el fin de garantizar que las partículas magnéticas respondan correctamente a un campo magnético externo.

Aparentemente, la composición farmacéutica según la invención presenta el beneficio de estar diseñada para indicaciones terapéuticas específicamente para enfermedades regionales y locales.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que porta el agente terapéutico tal como se ha indicado anteriormente, para la utilización como medicamento como primera indicación médica.

En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica tal como se ha indicado anteriormente, para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante orientación magnética del fármaco utilizando un campo magnético externo como segunda indicación médica. La composición farmacéutica de la invención resulta especialmente adecuada para portar agentes altamente tóxicos frente a un área de enfermedad local al aprovechar las propiedades magnéticas de la composición de partículas en respuesta a un campo magnético externo.

La composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante orientación magnética de fármaco puede administrarse, según el tipo de tejido diana y la naturaleza del fármaco, en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualesquiera métodos conocidos, incluyendo cualesquiera métodos de inyección. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que una aplicación intraarterial de la composición farmacéutica resulta especialmente favorable. En el caso de que se administre la composición farmacéutica por vía intraarterial, resulta posible evitar que las barreras metabólicas interfieran con una acumulación eficaz de las nanopartículas en el tejido diana. Además, mediante la aplicación intraarterial se evita el peligro de trombosis inducida por las nanopartículas.

Además, resulta preferente determinar el posicionamiento y la vascularización del tejido diana y la posición para acceder al sistema arterial mediante la obtención de imágenes angiográficas, por ejemplo mediante Dyna-CT, antes de la aplicación de la composición. Tras la determinación para el acceso al sistema arterial, la composición farmacéutica puede administrarse mediante tecnología de catéter, garantizando que la composición farmacéutica de nanopartículas inyectada pueda acumularse en el tejido diana mediante un campo magnético externo de una

manera muy eficiente. De acuerdo con lo anterior, sólo se requiere una fracción de la dosis sistémica estándar para conseguir un resultado terapéutico todavía mejor.

La composición farmacéutica para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante orientación magnética de fármacos utilizando un campo magnético externo preferentemente se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz que se ajusta mediante el seguimiento en línea del tejido diana. Por lo tanto, en el caso de que la composición farmacéutica contenga un agente de seguimiento resulta posible obtener una imagen de la acumulación de la composición en el tejido diana y detener el suministro continuo de la composición farmacéutica en el caso de que no pueda identificarse ninguna acumulación adicional. De esta manera resulta posible evitar la administración de una cantidad excesiva de la composición farmacéutica.

La composición puede administrarse de una vez en el caso de que ello resulte en el éxito terapéutico deseado. Sin embargo, en el caso de que resulte necesaria una administración repetida, según podría indicar el seguimiento angiográfico y basado en MRT, la administración puede repetirse tantas veces como resulte necesario. Mediante el seguimiento sucesivo del inicio y éxito de la terapia resulta posible evitar la administración de una cantidad excesiva de agentes tóxicos, evitando efectos secundarios no deseables.

En el caso de que se utilice para el tratamiento del cáncer utilizando la orientación magnética de los fármacos, la composición farmacéutica de la invención preferentemente se guía al tejido diana y se acumula en el mismo mediante la aplicación de un gradiente de campo magnético externo. Con el fin de conseguir los mejores resultados de acumulación resulta preferente que el gradiente de campo magnético presente una elevada densidad de flujo magnético, comprendida entre 0,5 y 1,5 T, preferentemente de aproximadamente 1 T, y un gradiente de campo magnético de entre 10 y 90 T/m, preferentemente superior a 30 T/m o incluso superior a 60 T/m.

Preferentemente, la composición farmacéutica se guía al tejido diana y se acumula en el mismo mediante un campo magnético multidireccional que es espacialmente variable, preferentemente mediante diferentes zapatas de polo. En el caso de que sea espacialmente variable, la presente invención puede guiar con precisión y acumular la composición farmacéutica en tejido diana de diversas apariencias de un modo muy preciso.

Aparentemente, las etapas de método anteriormente indicadas no se encuentran limitadas al tratamiento del cáncer tal como se ha indicado anteriormente, sino que también pueden aplicarse a otras enfermedades regionales o locales, tales como la arterioesclerosis, la artritis reumatoide y las inflamaciones (por ejemplo la osteomielitis).

Según un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para preparar la composición farmacéutica anteriormente indicada. El método comprende por lo menos las etapas de producir nanopartículas magnéticas de núcleo de óxido de hierro, recubriendo los núcleos de las partículas con el ácido graso ácido láurico y cargando mitoxantrona sobre la superficie de los núcleos de las partículas y/o en el interior de un agregado de núcleos de partículas mediante interacción electrostática.

El método de preparación de los núcleos de las nanopartículas magnéticas tal como se ha indicado anteriormente no se encuentra especialmente limitado y se han descrito en la literatura múltiples procedimientos de preparación. Desde el punto de vista de un procedimiento de preparación sencillo y fiable de los núcleos de nanopartícula especialmente adecuado para la presente invención resulta preferente que las partículas de óxido de hierro anteriormetne indicadas se precipiten a partir de una solución acuosa que contenga sales de hierro (II) y de hierro (III) mediante la adición de una base, que puede ser una solución de amonio. Lo anterior garantiza la obtención de partículas de óxido de hierro de un tamaño y estado de agregación favorables de una manera sencilla y fiable.

Como sales de hierro (II) y de hierro (III) resultan especialmente adecuados los cloruros o los sulfatos de hierro. Preferentemente, las sales de hierro (II) y de hierro (III) se proporcionan en una proporción molar de 2:3. Mediante el ajuste de dicha proporción molar específica la presente invención puede producir partículas de núcleo de Fe_2O_3/Fe_3O_4 monodominio y multidominio que presentan propiedades magnéticas favorables de una manera fiable.

Los núcleos de nanopartícula magnética producidos de esta manera se recubren seguidamente con el ácido graso. Ello se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones de temperatura elevada, con el fin de garantizara que las moléculas de ácido graso se unen covalentemente. Por lo tanto, los núcleos de nanopartícula preferentemente se suspenden, particularmente preferentemente en un medio acuoso, y la temperatura preferentemente se eleva a 60ºC o más, preferentemente a 90ºC o más. La temperatura elevada preferentemente se mantiene constante durante varios minutos, habitualmente entre 2 y 20 minutos. A continuación, se deja que la suspensión se enfríe lentamente hasta la temperatura ambiente. El procedimiento de recubrimiento puede ser un procedimiento de una vez o puede repetirse una o más veces. Mediante la repetición del procedimiento de recubrimiento por lo menos una vez resulta posible incrementar la cantidad del recubrimiento del ácido graso y, de esta manera, incrementar además posteriormente la cantidad de recubrimiento del agente anteriormente indicado.

Según una realización específica, las partículas de núcleo de Fe_2O_3/Fe_3O_4 monodominio y multidominio anteriormente indicadas se recubren con ácido láurico, repitiendo preferentemente el procedimiento de recubrimiento una vez.

El método de preparación de la invención preferentemente comprende además una etapa de autoclavado de la composición. Desde el punto de vista de la aplicación in vivo, resulta altamente preferente o incluso necesario autoclavar la composición farmacéutica de manera que se satisfagan las elevadas exigencias de esterilidad. La composición farmacéutica según la invención presenta la ventaja de que el recubrimiento que comprende un ácido graso es estable incluso bajo las condiciones de autoclavado aplicadas comúnmente (por ejemplo 120ºC, sobrepresión de 1 bar, 20 min). Lo anterior implica que las características de la composición farmacéutica no resultan modificadas por dicho procedimiento de autoclavado. En contraste con la técnica anterior, por ejemplo con los recubrimiento poliméricos de almidón, las nanopartículas de la composición farmacéutica de la invención que presentan un recubrimiento que comprende un ácido graso conservan sus características esenciales. Por lo tanto, las nanopartículas conservan sustancialmente su tamaño, el potencial Zeta y la capacidad de carga de los agentes anteriormente indicados, en caso de esterilizarse utilizando un procedimiento de autoclavado. El autoclavado preferentemente se aplica después de la etapa de recubrimiento de los núcleos de partícula con el ácido graso y antes de la carga con el agente anteriormente indicado.

El método de preparación de la composición farmacéutica comprende la etapa de carga de las nanopartículas, que comprenden el recubrimiento de ácido graso, con el agente mitoxantrona que comprende un esqueleto aromático y un heteroátomo. Dicho agente se adhiere directamente sobre la superficie de los núcleos de las partículas y/o en el interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática.

La etapa de carga preferentemente comprende diluir las partículas de núcleo magnético recubiertas con el fin de obtener un estado de dispersión, homogeneizar la dispersión y añadir dicho agente a temperatura ambiente de manera que se consiga una adhesión estable con una cantidad elevada. La dispersión preferentemente puede ser una dispersión acuosa. Además, la homogeneización puede llevarse a cabo con ayuda de cualesquiera medios convencionales adecuados, aunque resulta preferente homogeneizar la dispersión mediante tratamiento ultrasónico desde el punto de vista de una síntesis sencilla. La temperatura para la etapa de carga no se encuentra particularmente limitada pero no puede exceder una temperatura que entre en conflicto con la estabilidad del agente. Resulta suficiente añadir el agente a temperatura ambiente y la temperatura puede, por lo tanto, estar comprendida entre 10ºC y 35ºC.

El método para preparar la composición farmacéutica tal como se ha indicado anteriormente preferentemente comprende además el método de separación de las nanopartículas, de manera que se eliminan las partículas y aglomerados de partículas que presenten un tamaño de 200 nm o superior. Preferentemente, la etapa de separación elimina las partículas y aglomerados de partículas con un tamaño de 180 nm o superior. El método de separación no se encuentra especialmente limitado pero preferentemente puede llevarse a cabo mediante filtración, ya que la filtración no requiere caros medios de separación. Por ejemplo, la composición de nanopartículas puede filtrarse por un filtro de jeringa de 0,8 µm y por un filtro de jeringa de 0,22 µm. La filtración se lleva a cabo convencionalmente tras la carga con el agente anteriormente indicado, de manera que la composición farmacéutica filtrada se encuentra lista para la aplicación posterior en un sujeto que debe tratarse. Sin embargo, además de dicha etapa final de filtración, también puede llevarse a cabo, por ejemplo, una etapa de filtración antes de la etapa de recubrimiento con el agente anteriormente indicado.

Un método de preparación de la composición farmacéutica de nanopartículas también se ilustra esquemáticamente en la figura 1.

La presente descripción proporciona un método para guiar a un tejido diana del sujeto y acumular en el tejido la composición farmacéutica anteriormente indicada que se encuentra contenida en el sujeto, mediante un gradiente de campo magnético externo. El gradiente de campo magnético preferentemente presenta una elevada densidad de flujo magnético, comprendida entre 0,5 y 1,5 T, preferentemente de aproximadamente 1 T, y un gradiente de campo magnético de entre 10 y 90 T/m, preferentemente superior a 30 T/m o incluso superior a 60 T/m.

Mediante dichos parámetros del campo magnético resulta posible acumular con precisión la composición farmacéutica de nanopartículas de la invención en un tejido diana de cualquier forma. Por lo tanto, en comparación con, por ejemplo, los métodos convencionales basados en imanes permanentes, la invención puede incrementar la acumulación de la composición en un área local de cualquier forma y tamaño. El presente método permite tratar terapéuticamente un tejido diana. De esta manera, el método representa una terapia que resulta adecuada para cualquier tejido diana regional o local en cualquier sujeto. Por lo tanto, el tejido diana del que debe realizarse un seguimiento o tratarse no se encuentra específicamente limitado y el método resulta adecuado para cualquier enfermedad regional o local, tal como arterioesclerosis, artritis reumatoide e inflamaciones.

Preferentemente, el tejido diana en el método para guiar y acumular la composición farmacéutica es un tumor. Por lo tanto, resulta posible tratar terapéuticamente diversos tipos de cáncer de un paciente.

El método para guiar y acumular tal como se ha indicado anteriormente resulta muy eficiente al aprovechar un campo magnético que es multidireccional que es especialmente variable al presentar diferentes partes. En virtud de esta constitución resulta posible guiar y acumular la composición de una manera muy precisa y eficaz.

En el método anteriormente descrito, la composición farmacéutica se administra en el sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualesquiera métodos conocidos, incluyendo diversos métodos de inyección. La cantidad eficaz depende del tipo de tejido diana, su tamaño y peso, así como el tamaño y peso del sujeto que debe tratarse. Evidentemente la cantidad eficaz depende además del agente que debe administrarse en el sentido de su eficacia y toxicidad. Tal como se ha indicado anteriormente, resulta preferente administrar la composición por vía intraarterial, desde el punto de vista de reducir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica, evitando simultáneamente los efectos secundarios. Para la administración intraarterial preferentemente se utiliza tecnología de catéteres. La composición puede administrarse hasta una cantidad todavía tolerada por el sujeto bajo tratamiento.

Preferentemente, el método se lleva a cabo de manera que la cantidad de composición farmacéutica que debe administrarse se ajuste mediante el seguimiento en línea del tejido diana. De esta manera, se evalúa en tiempo real la acumulación de la composición farmacéutica en el tejido diana. Por lo tanto, en el caso de que el seguimiento en línea revele que ya no se ha conseguido ninguna acumulación adicional de la composición farmacéutica, puede detenerse la administración para evitar la aplicación de cantidades excesivas de la composición farmacéutica. Además, la composición puede administrarse únicamente una vez en caso de que ello resulte suficiente para el inicio y progresión del éxito terapéutico, es decir, la remisión tumoral. Sin embargo, la administración también puede repetirse, preferentemente después de que el seguimiento angiográfico o basado en MRT, revel que resulta necesario prolongar la terapia para obtener el éxito terapéutico deseado.

El método anteriormente indicado resulta especialmente eficaz si se aprovecha la determinación de la posición y vascularización del tejido diana y la posición para acceder al sistema arterial, lo que puede conseguirse a partir de imágenes angiográficas, por ejemplo mediante Dyna-CT. Tal como se ha indicado anteriormente, tras este tratamiento de determinación, puede administrarse la composición farmacéutica de la presente invención de una manera muy precisa en un área de aplicación designada, garantizando de esta manera que la máxima proporción de la composición farmacéutica alcance realmente el tejido diana.

La composición farmacéutica preferentemente se administra mediante tecnología de catéteres, garantizando que la composición farmacéutica de nanopartículas inyectada pueda acumularse posteriormente en el tejido diana mediante un campo magnético externo de una manera muy eficiente. Como resultado, sólo se requiere una fracción de la dosis sistémica estándar para conseguir el éxito terapéutico deseado.

A continuación se describe en detalle la presente invención basándose en ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Las nanopartículas y la composición de la presente invención se caracterizan y se determinan siguiendo los procedimientos siguientes.

Dispersión hidrodinámica en capas

Diámetro hidrodinámico: mediciones de dispersión láser dinámica (DLD, Nicomp 380 ZLS, Santa Barbara, CA, USA) del diámetro hidrodinámico de las partículas. Distribución de tamaños del análisis Nicomp de distribución ponderado según volumen (partículas sólidas).

Parámetros detallados:

Temperatura: 23ºC Viscosidad del líquido: 0,933 CP
Índice de refracción del líquido: 1,33
Punto de ajuste de la intensidad: 300 kHz
Ángulo de fibra externo: 90°
Ángulo de dispersión: 90°

Potencial Zeta

Se mide el potencial Zeta utilizando el mismo aparato al indicado para las mediciones del diámetro hidrodinámico aunque en el modo potencial Zeta.

Parámetros detallados:

Temperatura: 23ºC
Viscosidad del líquido: 0,933 CP
Índice de refracción del líquido: 1,33
Punto de ajuste de la intensidad: 300 kHz
Ángulo de fibra externo: 18,9°
Ángulo de dispersión: 14,06°
Constante dieléctrica: 78,5
Espaciado del electrodo: 0,4 cm
Intensidad de campo eléctrico: 10,5 V/cm

Autoclavado

H+P Varioklav E 400 EP-Z
Condiciones:

120ºC, 1 bar de sobrepresión, 20 min

Medición de DRIFT

Espectrómetro Varian Excalibur FTS 3100 con una resolución de 4 cm^{-1}.

Ejemplo 1

Se disolvieron 16,12 g de $FeCl_2 * 4H_2O$ y 32,33 g de $FeCl_3 * 6H_2O$ (proporción molar: 2:3) en 133 ml de agua. Bajo agitación se añadió solución de NH3 al 25% para precipitar las partículas de Fe_2O_3/Fe_3O_4. A continuación, se provocó la sedimentación del precipitado de óxido de hierro mediante almacenamiento sobre un imán permanente y se eliminó el cloro mediante lavado del precipitado de óxido de hierro con una solución acuosa que contenía 1,3% de NH_3. A continuación, se introdujo el óxido de hierro lavado en 200 ml de solución de NH_3 al 1,3% y se mezcló una alícuota de 20 ml de dicho ferrofluido en bruto con 2,7 mmoles de ácido láurico y se calentó a 90ºC bajo agitación. Se mantuvo la temperatura constante a 90ºC durante 4 minutos y seguidamente la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente (ΔT=1ºC/min). A continuación, se diluyó el ferrofluido con agua hasta un volumen 8,5 veces el volumen inicial, seguido del autoclavado. Una alícuota de este ferrofluido diluido (5 ml) se homogeneizó mediante tratamiento ultrasónico y se añadieron 350 ml de mitoxantrona (MTO, contenido: 2 mg/ml) al ferrofluido. A continuación, se filtró el ferrofluido funcionalizado a través de un filtro de jeringa de 0,8 µm y, posteriormente, a través de un filtro de jeringa de 0,22 µm. El ferrofluido obtenido de esta manera se encuentra listo para la aplicación y presenta las características siguientes:

Contenido de sólidos:

10,92 mg/ml

Fracciones en masa de contenido de sólidos:

Ácido graso: 28,8%; núcleo de óxido de hierro: 70,0%; MTO: 1.2%

Tamaño de partícula:

El tamaño de partícula del ferrofluido se caracterizó mediante dispersión láser antes y después de la etapa final de filtración, tal como se ilustra en la figura 2 (el eje x proporciona el diámetro de partícula en nm y el eje y proporciona la intensidad relativa del pico). Tal como se pone de manifiesto en la figura 2a, el ferrofluido no filtrado contiene tres picos-fracciones de tamaños diferentes: P1a, P2a y P3a. En concreto, la fracción pico P1a presentaba un diámetro medio de aproximadamente 20,7 nm (con una desviación estándar de 1,4 nm (6,9%)) en una cantidad de 44,0% (en volumen); la fracción pico P2a presentaba un diámetro medio de partícula de 83,6 nm (con una desviación estándar de 11,7 nm (14,0%)) en una cantidad de 46,1% en volumen, y la tercera fracción pico 3Pa presentaba un diámetro medio de partícula de 490,4 nm (con una desviación estándar de 67,6 nm (13,8%)) en una cantidad de 9,9% en volumen. Tras la filtración (figura 2b), el ferrofluido contenía dos fracciones, picos 1Pb y 2Pb. En concreto, la fracción pico 1Pb presentaba un diámetro medio de partícula de 15,6 nm (con una desviación estándar de 1,8 nm (11,4%)) en una cantidad de 73,0% en volumen y la fracción pico 2Pb presentaba un diámetro medio de partícula de 83,4 nm (con una desviación estándar de 11,5 nm (13,8%)) en una cantidad de 27,0% en volumen.

Potencial Zeta:

El ferrofluido filtrado presentaba un potencial Zeta comprendido en el intervalo de entre -25 y -30 mV.

Morfología de partícula:

Tal como se ilustra en la figura 3, una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) revela que las partículas monodispersas y multidispersas presentan un tamaño máximo de aproximadamente 100 nm.

Modo de unión de ácido graso y agente terapéutico:

El ferrofluido fue investigado mediante mediciones de rayos X de alta resolución (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, XPS) para confirmar que el agente terapéutico se adhería directamente sobre la superficie de los núcleos de las partículas y/o en el interior de agregados de los núcleos de las partículas mediante interacción electrostática. En las figuras 4A a 4C se ilustra un espectro de XPS ejemplar. La fig. 4A muestra las curvas de señal de 1 s de N para la mitoxantrona pura (4a), mitoxantrona + nanopartícula (4b) y nanopartícula de Fe_3O_4 (4c). La fig. 4B muestra las curvas de señal de 1 s de C para la mitoxantrona pura (4d), mitoxantrona + nanopartícula (4e) y nanopartícula de Fe_3O_4 (4f). La fig. 4C muestra las curvas de señal de 1 s de O para la mitoxantrona pura (4g), mitoxantrona + nanopartícula (4h) y nanopartícula de Fe_3O_4 (4i). De esta manera, las mediciones de XPS confirman la unión no covalente de la mitoxantrona mediante el átomo de nitrógeno a la superficie de la nanopartícula. Se investigó adicionalmente el ferrofluido mediante una medición de DRIFT para confirmar que el ácido graso se encontraba unido al núcleo de partícula mediante unión covalente. La fig. 5 muestra el espectro del ferrofluido puro (5a), mientras que el espectro 5b muestra ferrofluido y ácido láurico. La banda de absorción a 1.450-1.500 nm indica el enlace O-H, la banda de absorción a 1.700 nm indica el enlace C=O y la banda de absorción a 2.900 nm indica el enlace C-H del ácido láurico. Aparentemente, la curva 5c referente a ferrofluido + ácido láurico + MTO es congruente con el espectro 5b; no se encontraban presentes bandas de absorción adicionales, poniendo de manifiesto que MTO no presenta unión covalente.

Además, se investigó la solución de sobrenadante mediante mediciones de HPLC, confirmando que la solución de sobrenadante contenía menos de 8% en peso de la mitoxantrona añadida, poniendo de manifiesto que prácticamente la totalidad de la mitoxantrona se encontraba unida a las nanopartículas.

Por consiguiente, una nanopartícula del presente Ejemplo presenta la constitución ilustrada en la figura 6.

Estabilidad:

Se investigó la estabilidad de la composición farmacéutica de nanopartículas en medios diferentes para determinar la cantidad liberada de mitoxantrona dependiente del pH. La tabla ilustra la liberación de MTO en solución de Ringer tamponada tras 60 minutos para el ferrofluido del presente ejemplo y las partículas de referencia recubiertas con dextrano.

pH	liberación [%]	Liberación de partículas de referencia recubiertas con dextrano
7,172	1,6	31,7
5,945	1,6	42,2
5,403	1,8	61,9
4,146	3,7	86,3
3,13	37,7	87,9

Aparentemente, las partículas de la técnica anterior, tales como las partículas recubiertas con cisteína (datos no mostrados) y las recubiertas con dextrano, liberan mucha más mitoxantrona en comparación con las nanopartículas magnéticas de la presente invención que comprenden un recubrimiento de ácido graso.

Esterilidad

La esterilidad de la composición farmacéutica tras el autoclavado se confirmó mediante el método estándar de determinación de endotoxinas, que puso de manifiesto que la composición estable era estéril incluso 14 días después de la incubación.

Modelo de arteria *ex vivo*:

Las propiedades de respuesta de la composición farmacéutica a un campo magnético externo se investigaron en un modelo de arteria *ex vivo*. Se demuestra que la composición farmacéutica se acumula en diferentes segmentos arteriales de un modelo de arteria bajo la aplicación de un gradiente magnético de 16 T/m en la zapata de un polo. La fig. 8a ilustra una medición de magnetorelaxometría (MRX) (SQUID) de la cantidad de partículas de óxido de hierro. La fig. 8b ilustra una medición de HPLC del agente terapéutico mitoxantrona unido a las partículas de óxido de hierro. Tal como resulta evidente a partir de la figura 8, las nanopartículas del Ejemplo 1 se acumulan en los segmentos de arteria que presentan la distancia más corta a la zapata del polo del electroimán y, de esta manera, que presenta la influencia más fuerte del campo magnético. En la fig. 8, el eje X proporciona la posición de la zapata del polo respecto a la arteria y en la dirección de flujo de circulación del tampón. El número '0' indica la posición bajo la punta de la zapata del polo, mientras que -1 y +1 indican un segmento en posición relativa antes y después de la zapata del polo, respectivamente.

Distribución biológica y biodegradación:

Para los experimentos animales se utilizaron conejos blancos New Zealand. Los animales, que pesaban aproximadamente 4,5 a 5,2 kg, se trataron (i.v.) con MTO unido a ferrofluido que contenía una cantidad de fármaco de 10% en comparación con la dosis sistémica habitual, que requiere 10 mg de MTO/m^2 de superficie corporal (n=5). El otro grupo de estudio (n=6) recibió la dosis sistémica habitual de MTO pura. Tras 24 h, los animales fueron sacrificados y se recolectaron los órganos. Se procesaron órganos completos de hígado y riñón y se extrajo la MTO para el análisis de HPLC [4]. También se midieron homogenados de tejido con SQUID.

Resultados

Las mediciones de HPLC mostraban un elevado enriquecimiento en MTO en los riñones en ambos modos de aplicación (fig. 9). La aplicación de fármaco mediada por nanopartículas influyó drásticamente en la distribución biológicamente de MTO tras la inyección i.v. La aplicación de MTO pura (fig. 9A, diagrama izquierdo) condujo a 190 ng/g en el tejido hepático y 8.500 ng/g en el tejido renal. La administración guiada por nanopartículas de MTO (fig. 9A, diagrama derecho) condujo a una concentración de MTO de 86 ng/g en el hígado y de 540 ng/g en los riñones. Con este modo de aplicación, el enriquecimiento en MTO en los riñones sólo fue 6 veces mayor que en el hígado, en comparación con una acumulación incrementada en 44 veces tras la inyección i.v. pura. El cambio en la relación de enriquecimiento de MTO entre hígado y riñones se debe al sistema retículo-endotelial (SRE), que atrapa partículas no solubilizadas del flujo sanguíneo. Además, según la figura 9B, el SRE condujo a un enriquecimiento de las nanopartículas magnéticas en el hígado, confirmado por el análisis de SQUID (MRX) del óxido de hierro, que detectó más de 35 mg/g de óxido de hierro en el hígado, pero sólo trazas de menos de 1 mg/g en los riñones. Sin embargo, la cantidad de MTO no es proporcional al hierro detectado en el hígado, lo que conduce a la sospecha de que la MTO resulta liberada de las partículas durante su degradación.

Ejemplo 2

La composición de nanopartículas del Ejemplo 1 se utilizó para una terapia tumoral mediante orientación magnética del fármaco bajo las condiciones siguientes.

Aplicación:

Campo magnético: voltaje: 30 V; A: 70 A Campo de 1 T con un gradiente de 72 T/m en la zapata del polo

Animal A

Conejo con carcinoma de células escamosas VX 2 Peso: 3,9 kg Dosis aplicada: 1,5 ml de ferrofluido; cantidad de mitoxantrona (MTO)=0,198 mg, que corresponde a 8,3% de la dosis sistémica convencional.

Animal B

Conejo con carcinoma de células escamosas VX 2 Peso: 3,15 kg Dosis aplicada: 1,56 ml de ferrofluido; cantidad de mitoxantrona (MTO)=0,22 mg, que corresponde a 10,5% de la dosis sistémica convencional.

En ambos animales se administró el ferrofluido del Ejemplo 1 por vía intraarterial con una cánula intravenosa (IV) durante 10 min. A continuación se aplicó el campo magnético durante 5 min tras la inyección.

Se trató un tercer animal con una dilución 1:500 del ferrofluido para la obtención de imágenes de MRT de la distribución biológica en este conejo. Las imágenes de MRT confirmaron que el ferrofluido se había acumulado eficientemente en el tumor diana de una manera eficiente (datos no mostrados).

Tal como se ilustra en la figura 11, las imágenes angiográficas de Dyna-CT permiten observar que la presente terapia conduce a una remisión completa del tumor tras únicamente una aplicación de la composición farmacéutica de nanopartículas (ferrofluido) del Ejemplo 1 en una dosis correspondiente a 7-10% de la dosis sistémica convencional.

Ejemplo 3

Se repitió el procedimiento de preparación del Ejemplo 1. Sin embargo, se trató una alícuota de 40 ml del ferrofluido en bruto mediante ultrasonidos (Bandelin Sonorex Digitec) sin aplicación de un tratamiento térmico. A continuación, se añadieron 1,066 g de ácido láurico, la mezcla se calentó a 90ºC bajo agitación y manteniendo la temperatura durante 4 min. A continuación, se enfrió lentamente la suspensión y se repitió una vez el procedimiento de recubrimiento (1,066 g de ácido láurico, 90ºC durante 4 min). A continuación, se permitió que la suspensión se enfriase lentamente hasta la temperatura ambiente bajo agitación continua. A continuación, la suspensión se diluyó con agua hasta 8,5 veces el volumen (170 ml). Tras el autoclavado, se homogeneizaron dos veces en un baño ultrasónico 6 ml del ferrofluido que se recubría con ácido láurico. Se introdujeron 5,0 ml del ferrofluido recubierto en un recipiente de 50 ml y se agitó con vórtex. Bajo agitación se añadieron gota a gota 350 ml de solución de mitoxantrona (lista para el uso farmacéutico, 2 mg/ml).

El ferrofluido resultante se caracterizó tal como se indica en el Ejemplo 1, anteriormente.

El ferrofluido del Ejemplo 3 caracterizado de esta manera presentaba un contenido de sólidos de 10,92 mg/ml. Las fracciones másicas del contenido de sólidos eran de 30,25% de ácido graso, 68,50% de núcleo de óxido de hierro y 1,25% de MTO.

Además, el ferrofluido filtrado presentaba un potencial Zeta comprendido en el intervalo de entre -25 y -30 mV y las partículas monodispersas y multidispersas presentaban un tamaño máximo de aproximadamente 100 nm (una primera fracción pico que presentaba un diámetro medio de aproximadamente 11,0 nm con una desviación estándar de 0,7 nm en una cantidad de 86,2% en volumen, y una segunda fracción pico que presentaba un diámetro medio de partícula de 80,2 nm con una desviación estándar de 9,1 nm en una cantidad de 13,8% en volumen). Además, la solución de sobrenadante del ferrofluido contenía menos de 8% en peso de la mitoxantrona añadida.

Conclusión

La presente invención combina sinérgicamente la composición farmacéutica anteriormente indicada y el método específicamente adaptado anteriormente indicado para la guía y acumulación de dicha composición en un tejido diana. Aunque resulta adecuada para enfermedades regionales y locales de diversos tipos, resulta evidente que la composición farmacéutica y el método para su acumulación aprovechan plenamente sus capacidades en el tratamiento de los tumores.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica adecuada para la orientación magnética, comprendiendo la composición nanopartículas magnéticas, un medio de dispersión acuoso que presenta un contenido de sólidos de entre 8 y 25 mg/ml, comprendiendo las partículas un núcleo de partícula magnética y un recubrimiento que comprende un ácido graso, en el que el ácido graso es ácido láurico y en el que los núcleos de las partículas se recubren con 25 a 45 partes en peso del ácido graso por cada 100 partes en peso de núcleo de la partícula, en el que el núcleo de las partículas es un óxido de hierro, y en el que las partículas magnéticas comprenden además mitoxantrona, que se adhiere directamente sobre la superficie de los núcleos de las partículas y/o en el interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el núcleo de partícula es Fe_2O_3/Fe_3O_4 monodominio y multidominio.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que las partículas magnéticas presentan un tamaño de partícula inferior a 220 nm según medición mediante dispersión hidrodinámica de láser en un estado monodisperso o multidisperso en un medio acuoso.

4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la utilización como medicamento.

5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la utilización en el tratamiento del cáncer mediante la orientación magnética de fármacos utilizando un campo magnético externo.

6. Composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 5, en la que la composición se administra por vía intraarterial en una cantidad terapéuticamente eficaz y/o en la que el posicionamiento y la vascularización del tejido diana y el posicionamiento para acceder al sistema arterial se determinan a partir de imágenes angiográficas.

7. Composición farmacéutica para la utilización la reivindicación 5 ó 6, en la que la cantidad de la composición farmacéutica que debe administrarse se ajusta mediante el seguimiento en línea del tejido diana y/o en la que la composición se administra de una vez o mediante la administración repetida, preferentemente tras el seguimiento angiográfico y basado en MRT.

8. Composición farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que la composición farmacéutica se guía al tejido diana mediante la aplicación de un gradiente de campo magnético externo que presenta una densidad de flujo magnético elevada, de entre 0,5 y 1,5 T, y un gradiente de campo magnético de entre 10 y 90 T/m.

9. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo el método por lo menos las etapas siguientes:
- producir nanopartículas magnéticas de óxido de hierro a modo de dichos núcleos de partícula,
- recubrir dichos núcleos de partícula con ácido láurico por lo menos una vez, y
- cargar mitoxantrona sobre la superficie de los núcleos de partícula y/o en el interior de un agregado de los núcleos de partícula mediante interacción electrostática.

10. Método para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que las nanopartículas son partículas de óxido de hierro que se precipitan en una solución acuosa que contiene sales de hierro (II) y de hierro (III) mediante la adición de una base.

11. Método para preparar una composición farmacéutica según la reivindicación 9 ó 10, en la que el método comprende además una etapa de autoclavado de la composición.

12. Método para preparar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el método comprende además la etapa de separar las nanopartículas de manera que se eliminen las partículas y/o aglomerados de partículas con un tamaño de 220 nm o superior.

Fig. 1

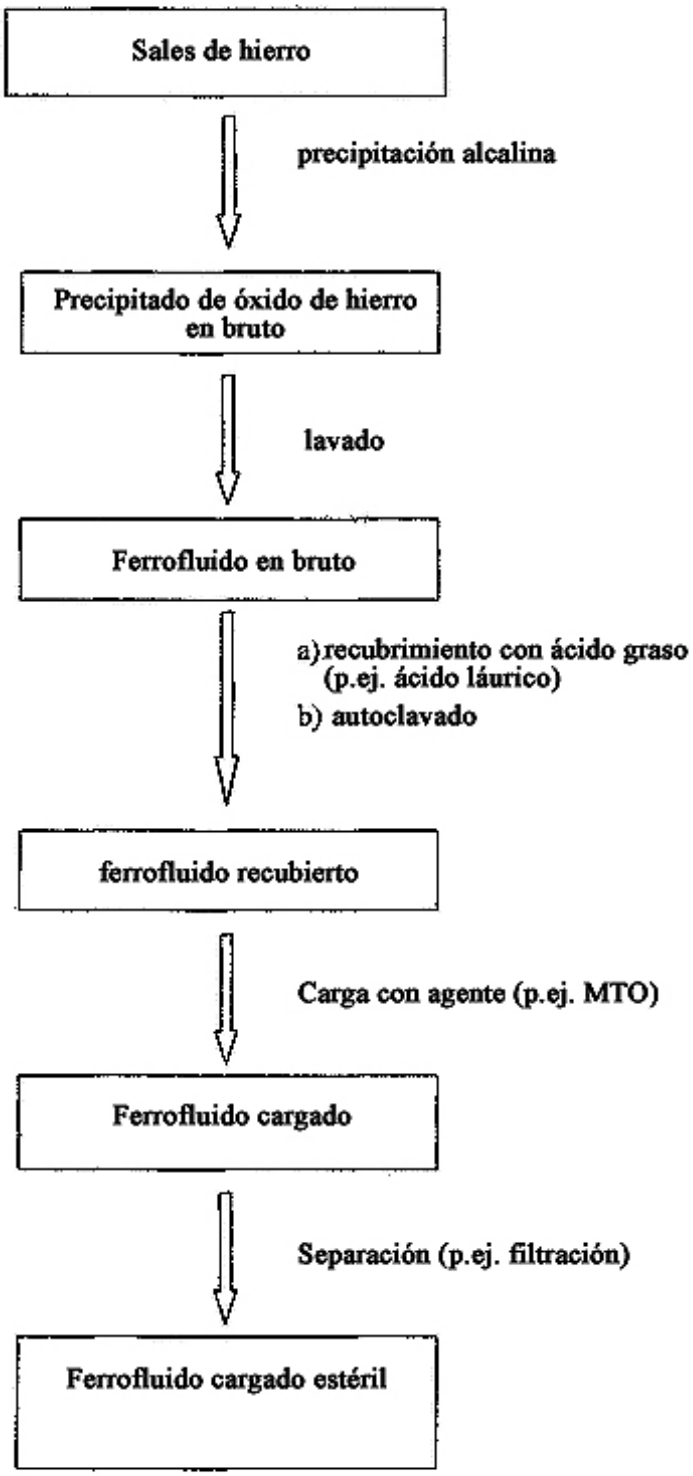

Sales de hierro
precipitación alcalina
Precipitado de óxido de hierro en bruto
lavado
Ferrofluido en bruto
a) recubrimiento con ácido graso (p.ej. ácido láurico)
b) autoclavado
ferrofluido recubierto
Carga con agente (p.ej. MTO)
Ferrofluido cargado
Separación (p.ej. filtración)
Ferrofluido cargado estéril

Fig. 2

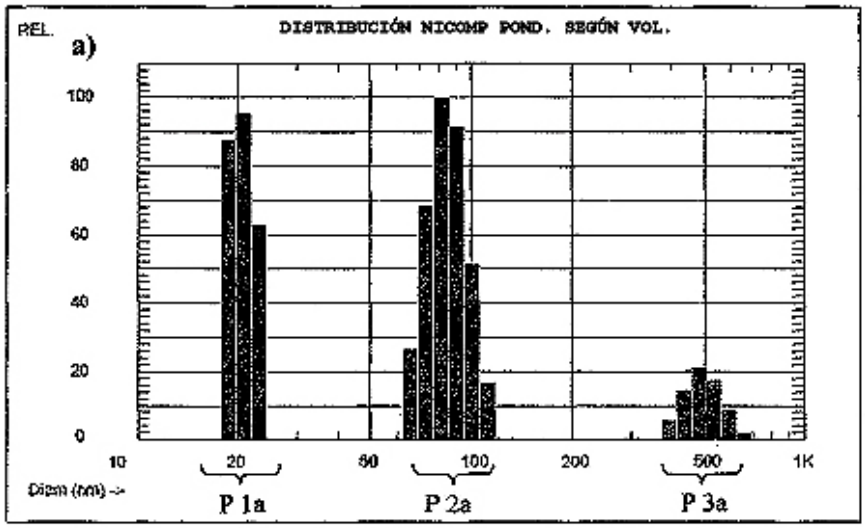
Análisis de DISTRIBUCIÓN NICOMP ponderado según volumen (partículas sólidas)

RESUMEN NICOMP:

Pico nº 1: Diam. medio = 20.7 nm, Desv.est.= 1.4 nm (6.9%) Vol= 44.0 %

Pico nº 2: Diam. medio = 83.6 nm, Desv.est.= 11.7 nm (14.0%) Vol= 46.1 %

Pico nº 3: Diam. medio = 490.4 nm, Desv.est.= 67.6 nm (13.8%) Vol= 9.9 %



RESUMEN NICOMP:

Pico nº 1: Diam. medio = 15.6 nm, Desv.est.= 1.8 nm (11.4%) Vol= 73.0 %

Pico nº 2: Diam. medio = 83.4 nm, Desv.est.= 11.5 nm (13.8%) Vol= 27.0 %

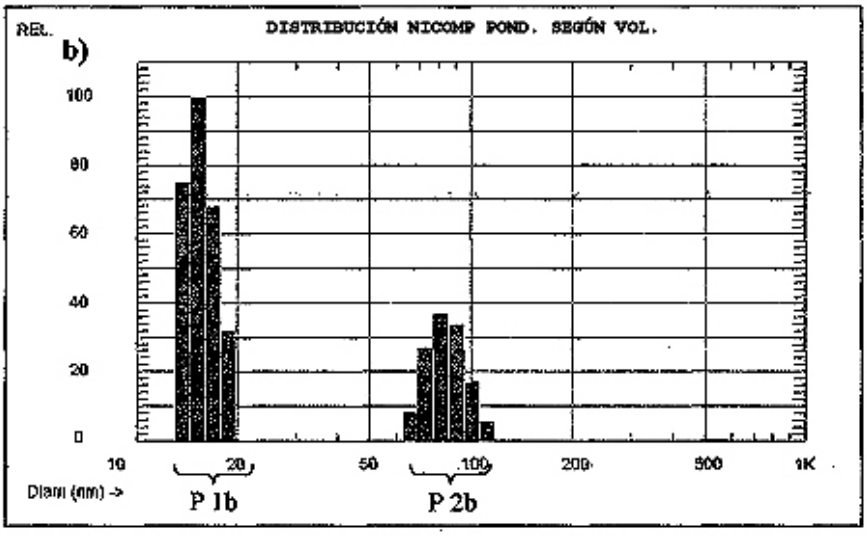


Fig. 3

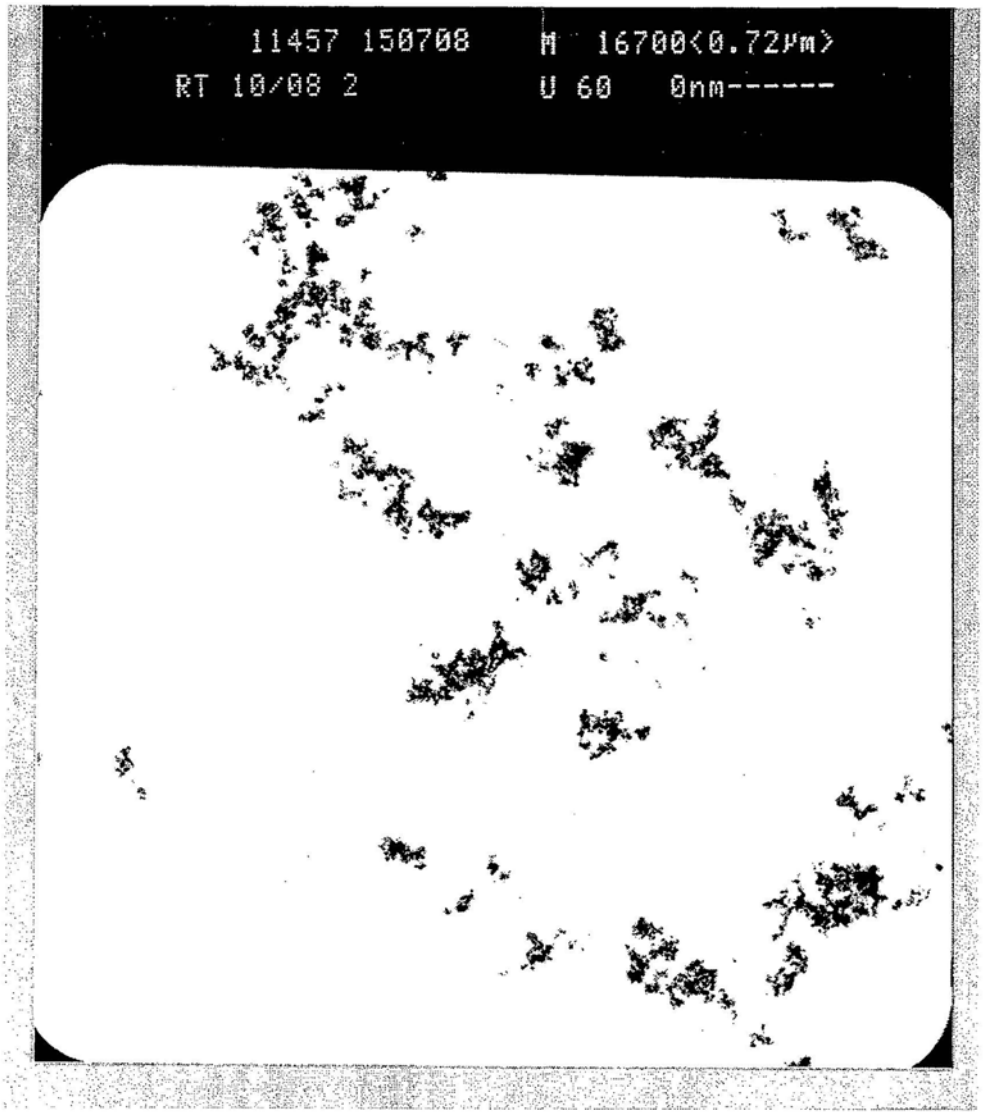


Fig. 4

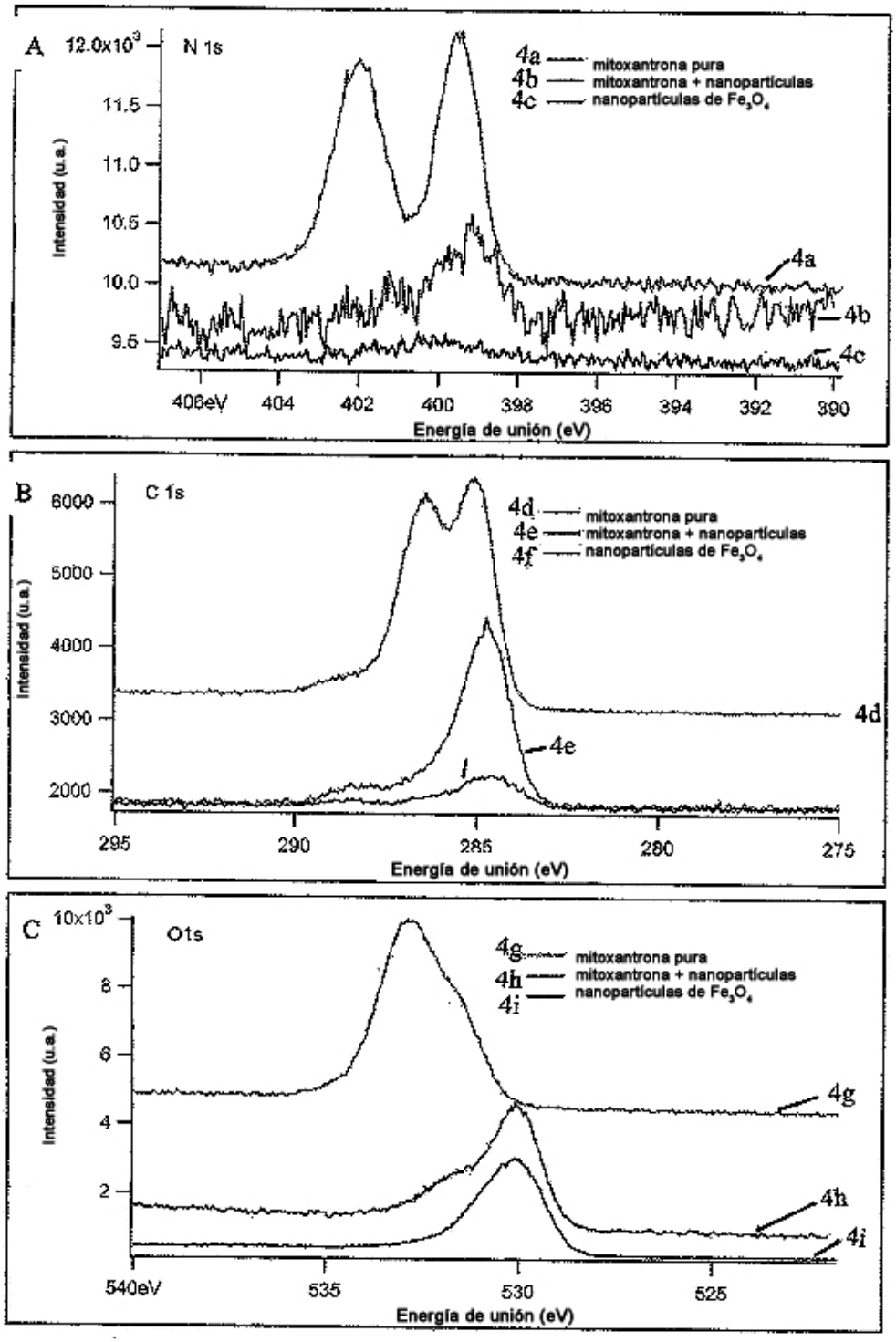

A
12.0x10³
N 1s
4a mitoxantrona pura
4b mitoxantrona + nanopartículas
4c nanopartículas de Fe₃O₄
Intensidad (u.a.)
11.5
11.0
10.5
10.0
9.5
4a
4b
4c
406eV
404
402
400
398
396
394
392
390
Energía de unión (eV)
B
C 1s
4d mitoxantrona pura
4e mitoxantrona + nanopartículas
4f nanopartículas de Fe₃O₄
Intensidad (u.a.)
6000
5000
4000
3000
2000
4d
4e
295
290
285
280
275
Energía de unión (eV)
C
10x10³
O1s
4g mitoxantrona pura
4h mitoxantrona + nanopartículas
4i nanopartículas de Fe₃O₄
Intensidad (u.a.)
8
6
4
2
4g
4h
4i
540eV
535
530
525
Energía de unión (eV)

Fig. 5

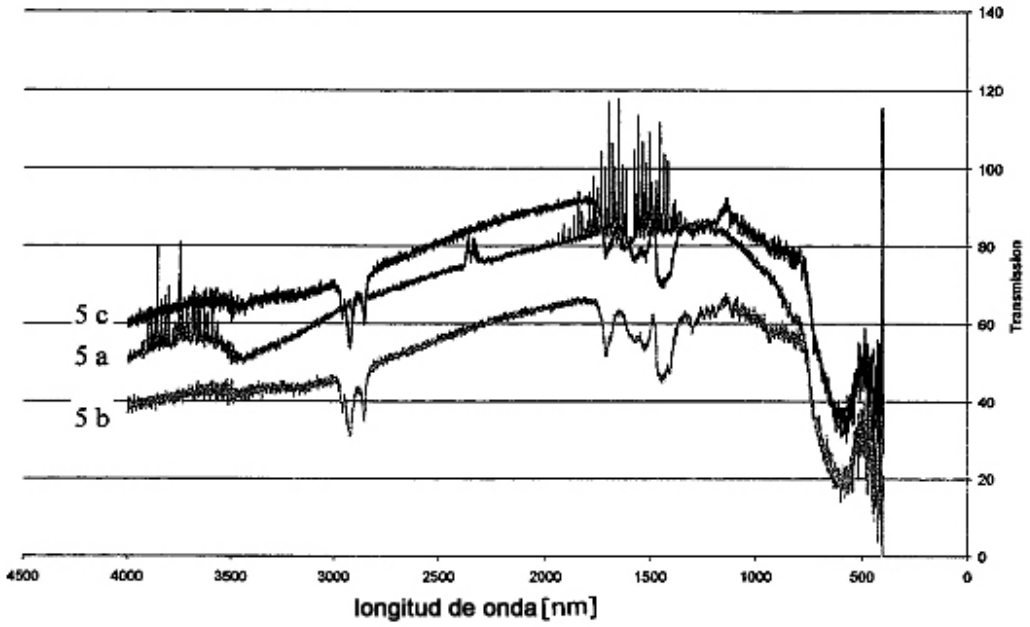
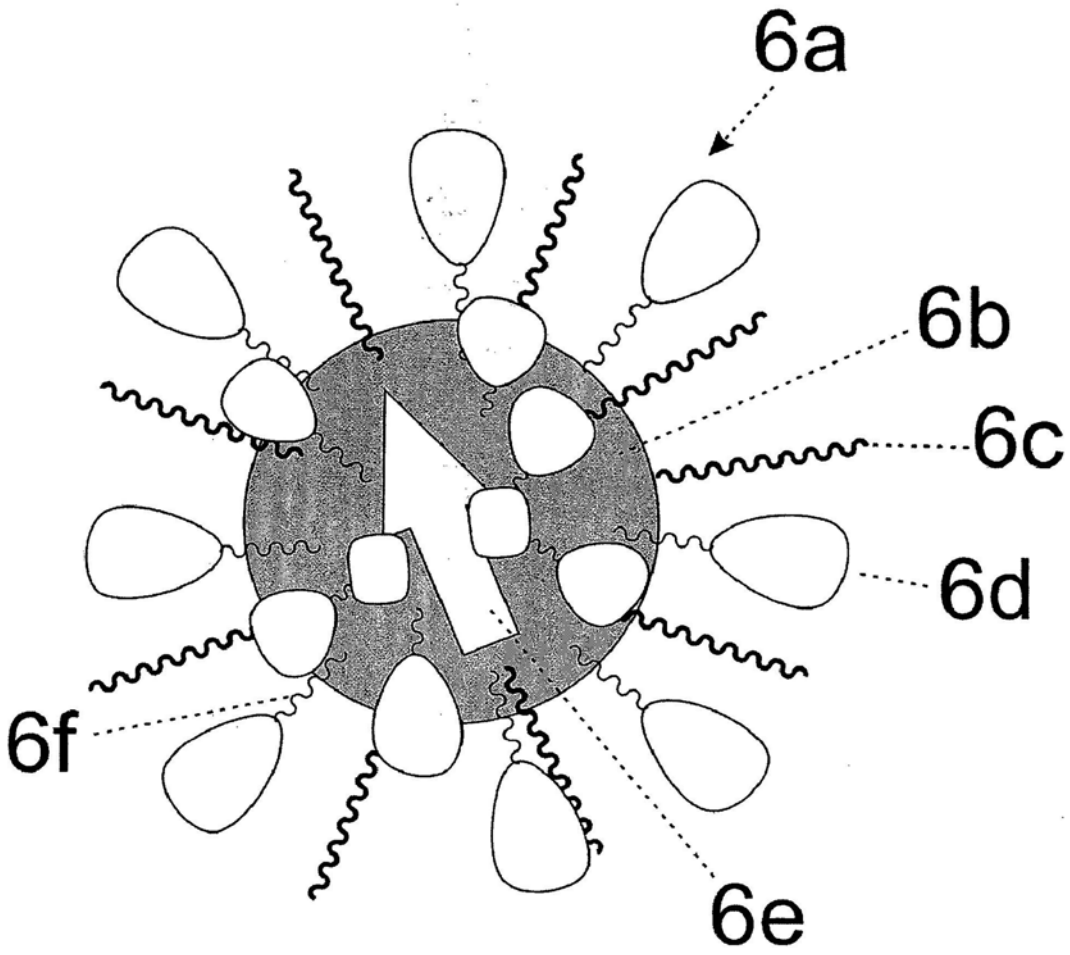

140
120
100
80
60
40
20
0
Transmisalon
5 c
5 a
5 b
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
longitud de onda [nm]

Fig. 6



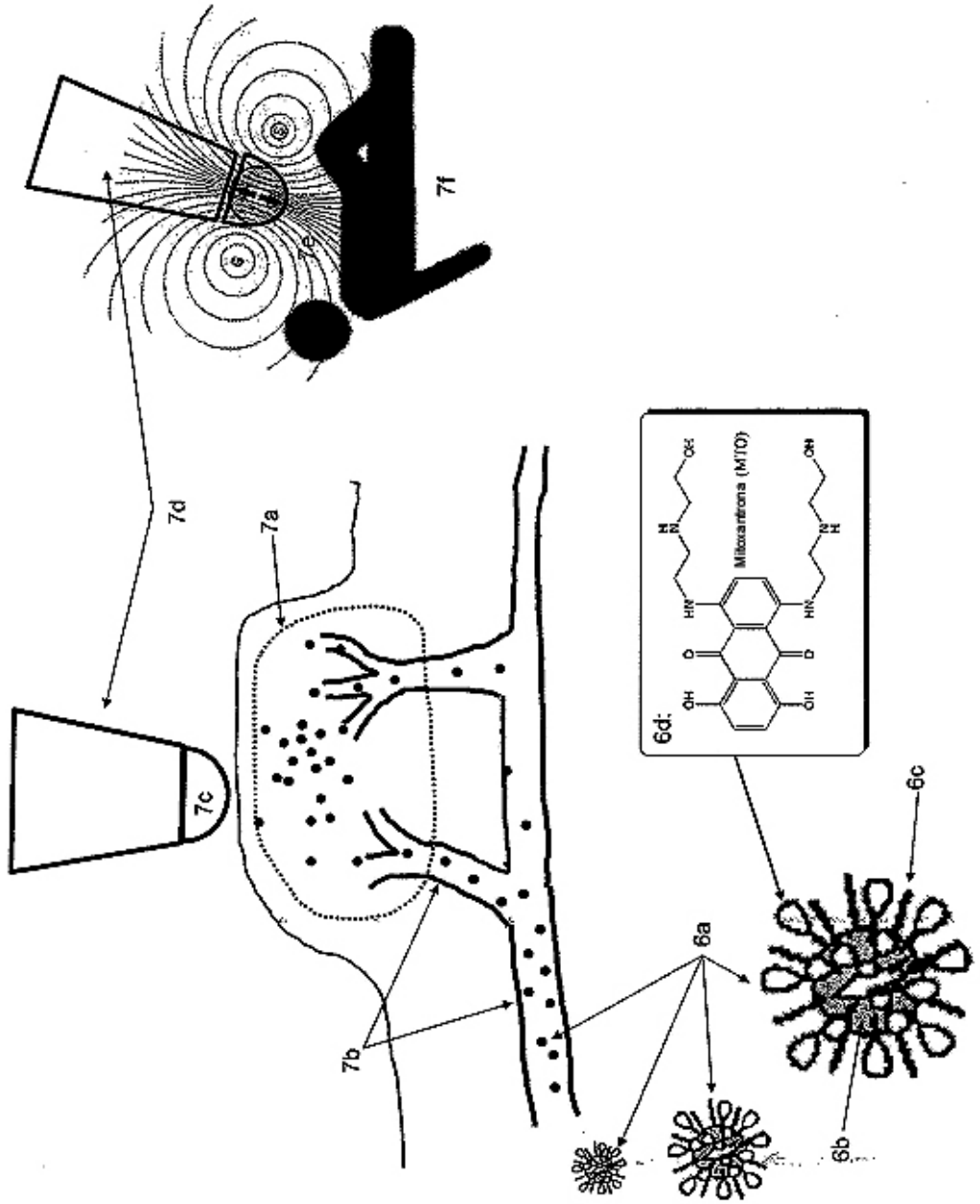


Fig. 7

Fig. 8

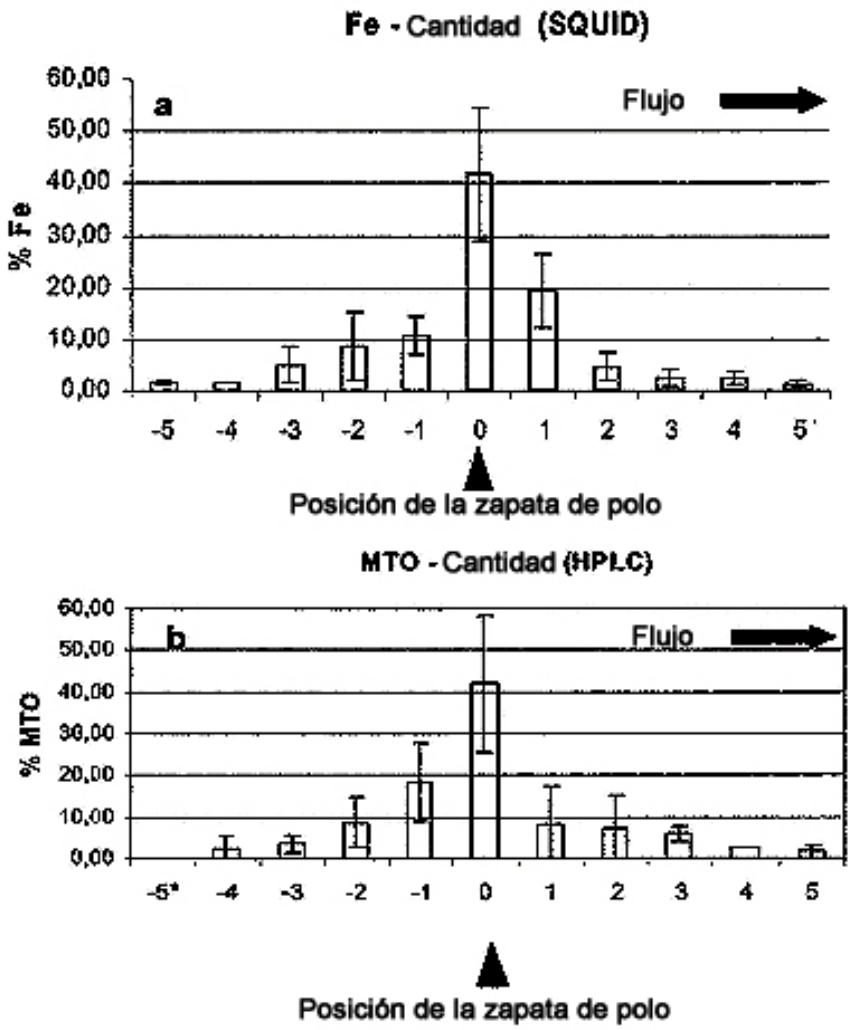
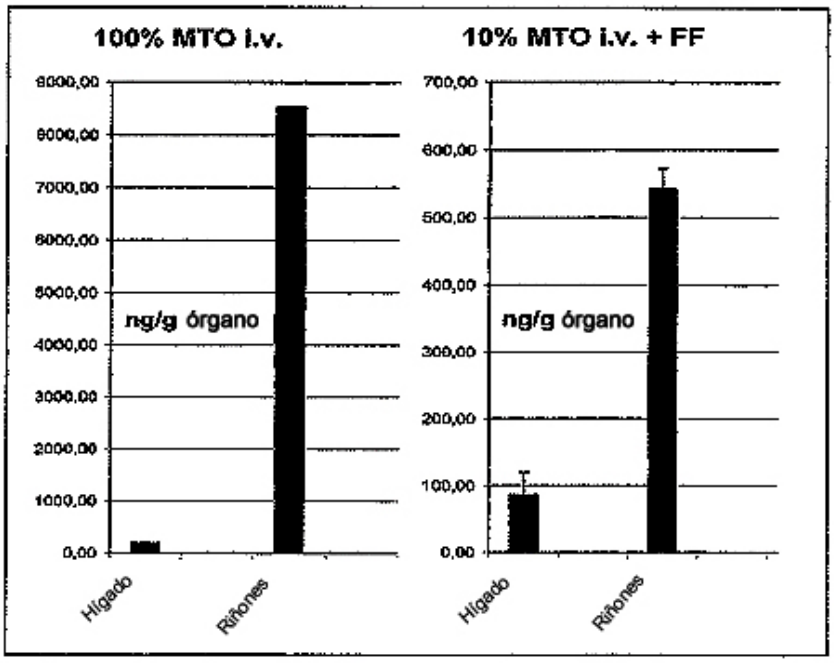
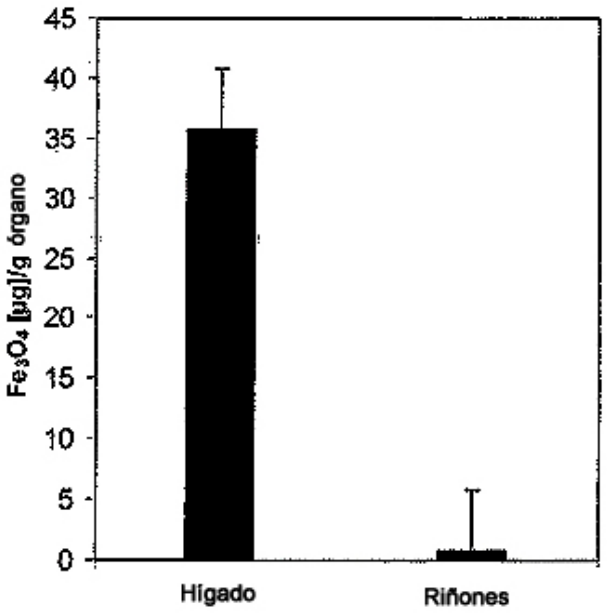

Fe - Cantidad (SQUID)
a
Flujo
% Fe
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Posición de la zapata de polo
MTO - Cantidad (HPLC)
b
Flujo
% MTO
60,00
50,00
40,00
30,00
20,00
10,00
0,00
-5*
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
5
Posición de la zapata de polo

Fig. 9

9A:


100% MTO i.v.
10% MTO i.v. + FF
ng/g órgano
ng/g órgano
Hígado
Riñones
Hígado
Riñones

9B:


Fe3O4 [µg]/g órgano
Hígado
Riñones

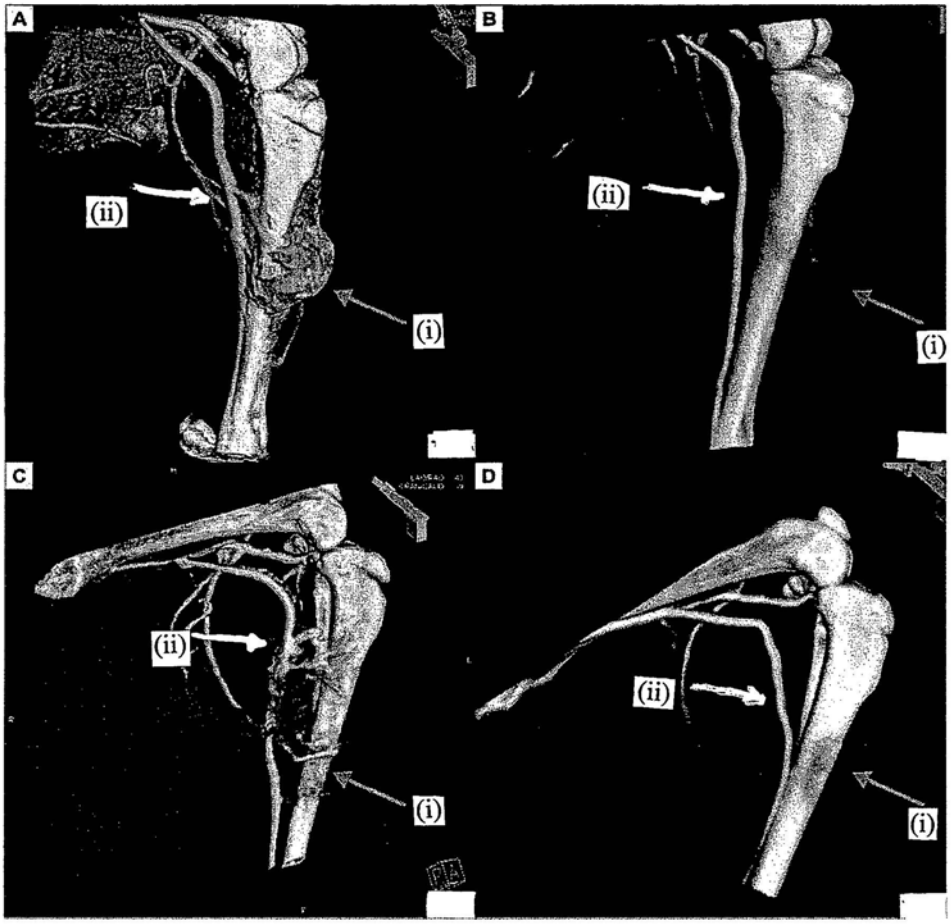



Fig. 10