

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 588**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10781494 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2370085**

54 Título: **Tratamiento de cáncer o tumor inducido por la liberación de calor generado por diversas cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas y sometidas a un campo magnético alterno**

30 Prioridad:

**18.11.2009 US 262260 P**

**06.08.2010 US 371385 P**

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

**02.07.2015**

73 Titular/es:

**NANOBACTERIE (100.0%)**

**36 Boulevard Flandrin**

**75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ALPHANDERY, EDOUARD;**

**FAURE, STÉPHANIE y**

**CHEBBI, IMÈNE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 539 588 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

Tratamiento de cáncer o tumor inducido por la liberación de calor generado por diversas cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas y sometidas a un campo magnético alterno

Campo de la invención:

5 La presente invención está en el campo de los tratamientos térmicos *in vivo* de células o tejidos, especialmente tumor(es) o células tumorales, usando el calor generado *in situ* por elementos magnéticos sometidos a un campo magnético alterno. La invención está en particular en el campo de la terapia térmica usando hipertermia o termoablación. El tipo de elemento magnético descrito en esta divulgación es una cadena de nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas mediante un proceso biológico.

10 Breve resumen de la invención:

Esta invención describe una termoterapia que puede usarse para destruir cáncer, tumor(es) o células tumorales. El calor se genera por cadenas de magnetosomas bacterianos que se extraen de bacterias magnetotácticas, en que la mayoría de magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena. Estas cadenas de magnetosomas que se usan en termoterapia pueden obtenerse cultivando las bacterias en las diversas condiciones siguientes:

(1) Se cultivan bacterias magnetotácticas (p.ej. ATCC 700274) en un medio de crecimiento estándar (p.ej. medio ATCC 1653 o un medio de crecimiento similar al medio ATCC 1653 adecuado para hacer crecer la cepa ATCC 700274).

20 (2) Se cultivan bacterias magnetotácticas en un medio de crecimiento que contiene el medio de crecimiento estándar tal como se menciona en (1) y preferiblemente un aditivo que es un metal de transición. Son ejemplos de metales de transición que pueden usarse cobalto, níquel, cobre, zinc, manganeso y cromo.

(3) Se cultivan bacterias magnetotácticas en un medio de crecimiento que contiene el medio de crecimiento estándar tal como se menciona en (1) y preferiblemente un aditivo que es un agente quelante. Se entiende preferiblemente por agente quelante un compuesto orgánico que es un ligando monodentado o polidentado capaz de formar un complejo con los cationes derivados de hierro o cualquiera de los demás metales de transición.

(4) Se cultivan bacterias magnetotácticas en un medio de crecimiento que contiene el medio de crecimiento ATCC estándar tal como se menciona en (1) y los dos aditivos mencionados en (2) y (3).

30 La presencia de aditivos en el medio de crecimiento bacteriano suministra una eficacia de calentamiento de magnetosoma mejorada (tanto en disolución como *in vivo*). Las cadenas extraídas de magnetosomas en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección de alargamiento de cadena, obtenidas sintetizando las bacterias en cualquiera de los cuatro medios de crecimiento diferentes descritos en (1) a (4), pueden encapsularse también en una vesícula lipídica en presencia o no de un principio activo y usarse como tales en la termoterapia.

Antecedentes:

35 Últimamente, se han dedicado grandes esfuerzos a sintetizar nanopartículas magnéticas que sean capaces de inducir la producción de calor cuando se les aplica un campo magnético oscilante (Duguet *et al.*, *Nanomed.*, 2006, 1, 157-168) y que puedan manipularse fácilmente usando campos magnéticos. Estos rasgos condujeron a la idea de que las nanopartículas magnéticas pueden ser útiles en la destrucción o eliminación de tumores mediante hipertermia o termoablación o que pueden usarse para liberar fármacos en regiones localizadas específicas del cuerpo. Este campo de investigación se designa a menudo como hipertermia por campo magnético alterno (CMA), puesto que requiere la aplicación de un campo magnético alterno para inducir la producción de calor por las nanopartículas. En trabajos previos, el calor se inducía usando nanopartículas sintetizadas químicamente, principalmente en forma de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION en inglés), que se mezclaban en disolución o se mezclaban con células o se administraban a un organismo vivo. Se evaluó también la actividad antitumoral de estas nanopartículas calentadas tanto en modelos animales como clínicamente en seres humanos. Se presenta una visión general del trabajo llevado a cabo anteriormente en las referencias enumeradas a continuación en la presente memoria (Bae *et al.*, *J. Controlled Release*, 2007, 122, 16-23; Ciofani *et al.*, *Med. Hypotheses*, 2009, 73, 80-82; De Nardo, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 7087s-7092s; De Nardo *et al.*, *J. Nucl. Med.*, 2007, 48, 437-444; Higler *et al.*, *Radiology*, 2001, 218, 570-575; Ito *et al.*, *Cancer. Sci.*, 2003, 94, 308-313; Ito *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, 96, 364-369; Ito *et al.*, *Cancer Lett.*, 2004, 212, 167-175; Ito *et al.*, *Cancer Immunol. Immun.*, 2006, 55, 320-328; Johannsen *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, 2005, 21, 637-647; Johannsen *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, 2007, 52, 1653-1662; Jordan *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, 1993, 9, 51-68; Kawai *et al.*, *Prostate*, 2005, 64, 373-381; Kawai *et al.*, *Prostate*, 2008, 68, 784-792; Kikumori *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2009, 113, 435-441; Maier-Hauff *et al.*, *J. Neurooncol.*, 2007, 81, 53-60; Oberdörster *et al.*, *Environ. Health Persp.*, 2005, 113, 823-839; Ponce *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, 2006, 22, 205-213; Tai *et al.*, *Nanotechnology*, 2009, 20, 135101; Thisen *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, 2008, 24, 467-474).

En este momento, hay al menos tres compañías que desarrollan terapia del cáncer usando el calor generado por nanopartículas magnéticas cuando se exponen estas últimas a un campo magnético alterno. Estas compañías son Sirtex (una compañía australiana), Magforce (una compañía alemana) y Aspen Medisys (una compañía estadounidense, anteriormente Aduro Biotech y Triton Biosystem). Las patentes que se han publicado por estas compañías describen diversos modos de usar el calor generado por nanopartículas magnéticas sintetizadas químicamente para terapia del cáncer (Sirtex: documentos US2006167313 o WO 2004/064921; Triton Biosystems ahora Aspen Medisys, LLC: US2003/0028071; Magforce: US2008/0268061).

Aunque se ha hecho un progreso significativo en el campo de la terapia del cáncer con nanopartículas, han surgido preocupaciones respecto a la toxicidad inducida por la presencia de las nanopartículas sintetizadas químicamente en el cuerpo (Habib *et al.*, *J. Appl. Phys.*, 2008, 103, 07A307-1-07A307-3). Para minimizar los efectos secundarios potenciales que surgen durante los tratamientos clínicos, la cantidad de nanopartículas administradas tiene que ser lo menor posible reteniendo su efecto deseado. Para ello, las nanopartículas magnéticas tienen que generar una cantidad de calor suficientemente grande, concretamente tasas de absorción específica (TAE) significativas.

Por lo tanto, existe la necesidad de nanopartículas magnéticas que tengan una capacidad de calentamiento mayor que la obtenida habitualmente con las nanopartículas sintetizadas químicamente. Esto será útil para reducir la cantidad de material magnético necesaria para calentar un tejido biológico o célula. Esto puede conseguirse usando nanopartículas con volúmenes grandes o con alta anisotropía magnetocristalina (Hergt *et al.*, *J. Phys. Condens. Matter*, 2006, 18, S2919-S2934).

Existe también la necesidad de desarrollar nanopartículas magnéticas que puedan tener dichas buenas propiedades y la capacidad de direccionarse hacia un tejido o célula

En parte debido a su gran volumen, los magnetosomas sintetizados por bacterias magnetotácticas producen una mayor cantidad de calor que las nanopartículas sintetizadas químicamente cuando se somete a un campo magnético oscilante. Esto se ha mostrado para magnetosomas bacterianos mezclados en disolución (Hergt *et al.*, *J. Phys. Condens. Matter*, 2006, 18, S2919-S2934; Hergt *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2005, 293, 80-86; Timko *et al.*, *J. Mag. Mag. Mat.*, 2009, 321, 1521-1524). En las referencias anteriores, el tipo de magnetosomas bacterianos usados para llevar a cabo los experimentos no se ha identificado claramente.

Los magnetosomas son cristales intracelulares, unidos a membrana, de tamaño nanométrico y de un solo dominio magnético del óxido de hierro magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o del sulfuro de hierro greigita ( $\text{FeS}_4$ ) que se sintetizan por bacterias magnetotácticas. Los magnetosomas compuestos por magnetita pueden oxidarse hasta maghemita después de la extracción de las bacterias. Los magnetosomas se disponen habitualmente como una cadena en las bacterias, pero pueden encontrarse también magnetosomas individuales. Las bacterias parecen usar los magnetosomas para navegar por el campo geomagnético de la Tierra y ayudarlas a localizar y mantener las condiciones óptimas para su crecimiento y supervivencia (Bazylinski *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2, 217-230). Los magnetosomas y cristales de magnetita de magnetosoma han mostrado ser útiles en una serie de aplicaciones científicas, comerciales y sanitarias. Por ejemplo, pueden usarse para detectar polimorfismo de nucleótido simple, para extraer ADN o para detectar magnéticamente interacciones biomoleculares. Pueden usarse también en inmunoensayo y ensayo de unión a receptor o en separación celular (Arakaki *et al.*, *J. R. Soc. Interface*, 2005, 5, 977-999). Se ha sugerido que los magnetosomas bacterianos podrían insertarse en liposomas con fines de provisión de fármacos (número de patente US6251365B1). Sin embargo, se han dado muy pocas pruebas experimentales en esta patente y la capacidad de calentamiento de dicho liposoma no se ha demostrado ni sugerido. Se ha mostrado experimentalmente la actividad anticancerosa de un complejo formado por magnetosomas bacterianos y doxorubicina (Sun *et al.*, *Cancer Lett.*, 2007, 258, 109-117). En este caso, la actividad anticancerosa es debida a la presencia de doxorubicina y no a un tratamiento inducido por calor. Al final, no se ha probado que los magnetosomas bacterianos sean útiles para el tratamiento térmico *in vitro* o *in vivo* de células de tumor o cáncer.

Finalmente, dos estudios recientes se dirigen brevemente al asunto planteado por la potencial toxicidad de los magnetosomas bacterianos en ratas y no reseñan ninguna señal de toxicidad (Sun *et al.*, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2009, 9, 1881-1885; Sun *et al.*, Sun *et al.*, *Nanotoxicology*, 2010, 4, 271-283).

#### Descripción de la invención

Pueden ser eficaces diferentes tipos de magnetosomas bacterianos (organizados en cadenas o no y contenidos en las bacterias o extraídos de las bacterias) para generar calor en disolución cuando se exponen a un campo magnético alterno. Sin embargo, como se demuestra en esta divulgación, solo los magnetosomas organizados en cadenas y aislados de las bacterias magnetotácticas suministran una actividad antitumoral eficaz. Es más, se estudiaron también magnetosomas bacterianos contenidos en bacterias magnetotácticas AMB-1 enteras y magnetosomas individuales (extraídos de las bacterias y tratados con dodecilsulfato de sodio (SDS) y calor). A pesar de sus buenas propiedades de calentamiento en disoluciones, estos dos tipos de magnetosomas bacterianos parecían suministrar nada o mucha menos actividad antitumoral *in vivo* que las cadenas de magnetosomas aisladas de bacterias magnetotácticas, en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena según la invención. El impacto de la organización en las cadenas de magnetosomas bacterianos sobre la eficacia de la termoterapia es una contribución importante de la

invención.

La presente descripción se refiere a cadenas de magnetosomas aisladas de bacterias magnetotácticas en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena para uso en el tratamiento de tumor(es) mediante terapia térmica, preferiblemente de un tumor sólido. Estas cadenas pueden usarse como tales o encapsularse en una vesícula.

La presente descripción se refiere al tratamiento *in vivo* de tejidos o células, especialmente de tumor(es) o célula(s) tumoral(es), usando el calor generado *in situ* por cadenas de magnetosomas. El tipo de tumor que puede tratarse es de preferencia un tumor sólido. Estas cadenas pueden usarse como tales o encapsuladas en una vesícula. El calor se produce sometiendo las cadenas de magnetosoma a un campo magnético alterno (también llamado campo magnético oscilante).

La presente descripción se refiere también a cadenas de magnetosomas como fármaco, especialmente como fármaco para tratamiento antitumoral. Las cadenas pueden usarse como tales o encapsuladas en una vesícula.

La descripción se refiere también al uso de cadenas de magnetosomas como medio de calentamiento, especialmente de un tejido vivo o células vivas *in vivo*.

La descripción se refiere también al uso de cadenas de magnetosomas como fármaco que posibilita el tratamiento de tumor(es) y/o células tumorales mediante un método de calentamiento.

La siguiente descripción de realizaciones y rasgos se aplica al método de tratamiento y al uso de las cadenas de magnetosomas.

Es importante destacar que la invención se refiere a la administración de cadenas de magnetosomas a un paciente necesitado. Sin embargo, es posible que después de la administración al organismo se altere una pequeña cantidad de las cadenas de magnetosomas; la alteración de estas cadenas de magnetosomas puede dar como resultado la formación de cadenas más largas o más cortas que las administradas y menos probablemente la aparición de magnetosomas individuales.

Los magnetosomas administrados durante la terapia están en forma de cadenas de magnetosomas. Por definición, estas cadenas de magnetosomas se aíslan de bacterias magnetotácticas. Esto significa que no están contenidas en las bacterias. Preferiblemente, las cadenas se han extraído de las bacterias usadas para su producción y aislado de los fragmentos celulares. Estas cadenas de magnetosomas contienen preferiblemente entre 2 y 30 magnetosomas, típicamente entre 4 y 20 magnetosomas. La mayoría de los magnetosomas pertenecientes a estas cadenas poseen direcciones cristalográficas y preferiblemente también ejes fáciles orientados en la dirección del alargamiento de cadena, que es habitualmente [111] (Alphandéry *et al.*, ACS Nano, 2009, 3, 1539-1547). En consecuencia, las cadenas de magnetosomas poseen una anisotropía magnética que es más fuerte que la de los magnetosomas individuales. Como resultado, se previene una fuerte agregación de las cadenas de magnetosomas. Cuando interaccionan varias cadenas de magnetosomas que contienen típicamente entre 4 y 20 magnetosomas, da como resultado la formación de una cadena más larga de magnetosomas, que contiene típicamente más de 4 a 20 magnetosomas. La longitud de la cadena de magnetosomas es preferiblemente menor de 1200 nm, más preferiblemente menor de 600 nm, lo más preferiblemente menor de 300 nm. La disposición en cadenas de los magnetosomas suministra varias propiedades que son ventajosas para el calentamiento *in vivo*. Debido a su disposición en cadenas, los magnetosomas no tienden a la agregación y poseen también un momento magnético estable. Ambas de estas propiedades favorecen la rotación de las cadenas de magnetosomas y por lo tanto la producción de calor mediante este mecanismo. La disposición en cadenas de los magnetosomas proporciona también una interacción con las células eucarióticas, que es ventajosa debido a su bajo nivel de agregación. Esta interacción da como resultado una internalización de las cadenas de magnetosomas en las células eucarióticas. Por ejemplo, como se describe con más detalles en el ejemplo 4, se vuelven magnéticas un porcentaje significativo de células cuando se mezclan las cadenas de magnetosomas con las células mientras se aplica el campo magnético alterno. En una realización, las cadenas de magnetosomas penetran en las células eucarióticas cuando se aplica el campo magnético alterno, posibilitando así la destrucción de las células mediante el mecanismo de hipertermia intracelular. Este mecanismo es potencialmente más eficaz que la hipertermia extracelular, puesto que destruye las células desde el interior. Por otro lado, se obtiene un porcentaje muy pequeño de células magnéticas cuando se mezclan las células en presencia de magnetosomas individuales mientras se aplica el campo magnético alterno, sugiriendo que los magnetosomas individuales permanecen fuera de las células eucarióticas, suministrando un mecanismo menos eficaz de destrucción celular.

Los magnetosomas se definen como nanopartículas de óxido de hierro magnéticas hechas de magnetita, maghemita o una composición que es intermedia entre maghemita y magnetita. Los magnetosomas se caracterizan también por la presencia de una membrana biológica que los rodea. La presencia de grupos amino en la superficie de la membrana de magnetosoma posibilita el acoplamiento con diversas macromoléculas bioactivas y suministra biocompatibilidad (Xiang *et al.*, Lett. Appl. Microbiol., 2007, 6, 75-81; Sun *et al.*, Cancer Lett., 2007, 258, 109-117; Sun *et al.*, Biotech. Bioeng., 2008, 101, 1313-1320).

En una realización, los magnetosomas pertenecientes a la cadena están rodeados por una membrana biológica. Los

magnetosomas pueden estar unidos entre sí mediante un filamento biológico cuya estructura es solo parcialmente conocida según A. Komeili, Ann. Rev. Biochem. 2007, 76, 351-366.

En una realización, los magnetosomas se sintetizan biológicamente por bacterias magnetotácticas tales como *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1, la cepa de coco magnetotáctico MC-1, tres cepas de *Vibrio* anaeróbicas facultativas MV-1, MV-2 y MV-4, *Magnetospirillum magnetotacticum* cepa MS-1, *Magnetospirillum gryphiswaldense* cepa MSR-1, un espirilo magnetotáctico anaeróbico facultativo, *Magnetospirillum magneticum* cepa MGT-1, y uno anaeróbico obligado, *Desulfovibrio magneticus* RS-1.

Los tamaños o tamaños medios de los magnetosomas individuales contenidos en las cadenas de magnetosomas pueden variar dependiendo en particular de la cepa de bacterias, del medio de crecimiento bacteriano y/o de las condiciones de cultivo bacteriano. Lo más frecuentemente los magnetosomas son nanopartículas de monodominio (concretamente, poseen solo un dominio magnético) con tamaños que se encuentran entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 120 nm, preferiblemente entre 10 y 70 nm, lo más probablemente entre 30 y 50 nm. La distribución de tamaños de los magnetosomas puede variar bastante significativamente dependiendo de la cepa bacteriana y de las condiciones de crecimiento bacteriano. En la especie AMB-1, la mayoría de los magnetosomas poseen tamaños que se encuentran entre 30 y 50 nm. Puede obtenerse un aumento de tamaño cuando se lleva a cabo la producción de los magnetosomas en presencia de uno o varios aditivos tales como los descritos en la invención. Los grandes tamaños de los magnetosomas dan como resultado comportamientos ferrimagnéticos a las temperaturas alcanzadas durante el tratamiento. Suministran también un momento magnético térmicamente estable. Por ello, el movimiento de los magnetosomas en el organismo podría controlarse potencialmente aplicando un campo magnético externo. Debido a su momento magnético estable, los magnetosomas deberían producir una mejor respuesta magnética que las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION) menores usadas actualmente para aplicaciones médicas, que poseen un momento magnético térmicamente inestable. Los magnetosomas, que son nanopartículas de monodominio grandes, poseen también mejores propiedades de calentamiento que la mayoría de nanopartículas sintetizadas químicamente (habitualmente en forma de SPION) cuando se suspenden en disolución y se exponen a un campo magnético alterno.

En una realización, los magnetosomas poseen una distribución estrecha de tamaño cuando las bacterias magnetotácticas se hacen crecer en condiciones óptimas.

En una realización, puede llevarse a cabo una etapa de selección de tamaño usando un campo magnético de intensidades variables (0,05-1 T), una técnica de cromatografía de selección por tamaño (usando por ejemplo una columna de tipo Sephacryl S1000) o una técnica de centrifugación, que posibilita librarse de los magnetosomas menores que permanecen en el sobrenadante. Usar magnetosomas con tamaños que se encuentran en un intervalo dado puede ser también útil para introducirlos en vesículas de un tamaño dado, por ejemplo.

En una realización específica, el tratamiento usa cadenas de magnetosomas encapsulados en una vesícula, especialmente una vesícula lipídica. La encapsulación de las cadenas de magnetosomas suministra propiedades de calentamiento mejoradas y reduce también los riesgos de toxicidad al prevenir el contacto directo entre las cadenas de magnetosomas y el organismo. La rotación de las cadenas de magnetosomas *in vivo* puede mejorarse mediante su encapsulación en una vesícula lipídica o un tipo similar de estructura.

En una realización, la vesícula lipídica es una vesícula unilamellar pequeña (SUV en inglés, diámetro <100 nm), que contiene una cantidad reducida de cadenas pequeñas de magnetosomas. En comparación con una vesícula más grande, las SUV poseen varias ventajas. Por ejemplo, son menos reconocibles por los macrófagos (Genc *et al.*, Langmuir, 2009, 25, 12604-12613).

En otra realización, la vesícula lipídica es una vesícula unilamellar grande (LUV en inglés, diámetro que se encuentra entre 100 nm y 1 µm) o una vesícula unilamellar gigante (GUV, diámetro >1 µm). Es más preferiblemente una LUV para inyección intravenosa. En los casos de LUV o GUV, la capacidad de captación de magnetosomas es significativamente mayor que la de SUV y por ello la eficacia de calentamiento es mayor.

En una realización, la vesícula lipídica es un liposoma, que es multilamellar.

En una realización, la vesícula lipídica está compuesta por un solo lípido con carga neutra tal como DOPC (1-oleoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DSPC (1,2-diesterail-sn-glicero-3-fosfocolina), DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina o DPPE (dipalmitoilfosfatidiletanolamina).

En otra realización, la vesícula lipídica está compuesta por lípidos neutros tales como los mencionados anteriormente mezclados con lípidos cargados tales como DOPG (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]) o DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol). Se mezclan lípidos con diversas cargas conjuntamente para optimizar la carga de superficie de la vesícula. Es más, esto último es un parámetro importante para la encapsulación de cadenas de magnetosomas con las vesículas y para la internalización de las vesículas en las células (Martina *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 10676; Tai *et al.*, Nanotechnology, 2009, 20, 13501).

El tratamiento pretende proporcionar una terapia térmica *in vivo*, incluyendo hipertermia y termoablación.

- En una realización, el tratamiento muestra un modo de destruir parcial o totalmente las células tumorales o el tumor mediante un aumento de la temperatura en el tumor de menos de  $\sim 10^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura fisiológica ( $37^{\circ}\text{C}$ ), una técnica habitualmente llamada hipertermia. En una realización preferida, la temperatura en el tumor alcanzada durante la hipertermia se encuentra entre aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente a aproximadamente  $43^{\circ}\text{C}$ .
- En otra realización, el tratamiento muestra un modo de destruir células tumorales o un tumor mediante un aumento de la temperatura del tumor de más de  $\sim 10^{\circ}\text{C}$  por encima de la temperatura fisiológica, ( $37^{\circ}\text{C}$ ), una técnica llamada habitualmente termoablación. La temperatura alcanzada durante la termoablación se encuentra entre aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $100^{\circ}\text{C}$ , más preferiblemente entre aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $70^{\circ}\text{C}$ .
- En una realización preferida, la temperatura en el tumor alcanzada durante la termoablación se encuentra entre aproximadamente  $45^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $55^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $50^{\circ}\text{C}$  y aproximadamente  $55^{\circ}\text{C}$ , lo más preferiblemente a aproximadamente  $53^{\circ}\text{C}$ ,  $54^{\circ}\text{C}$  o  $55^{\circ}\text{C}$ .
- Puesto que el calor se produce muy localmente (a escala nanométrica), podrían alcanzarse temperaturas relativamente altas localmente durante el tratamiento.
- Las temperaturas indicadas anteriormente son temperaturas alcanzadas en los tumor(es), el tejido tumoral y/o su entorno. La temperatura en las células tumorales (concretamente, cerca de los magnetosomas internalizados) podría ser mayor.
- Es un objeto de la presente descripción un método para la destrucción parcial o total de células tumorales o de un tumor. Las células tumorales pueden destruirse o perder su capacidad de multiplicarse indefinidamente cuando se les aplica el tratamiento térmico descrito en esta invención. Puesto que las células tumorales son más sensibles al calor que las células sanas (véase, por ejemplo: Overgaard *et al.*, *Cancer*, 1977, 39, 2637-2646), la termoterapia descrita en esta divulgación podría destruir selectivamente células tumorales.
- El tratamiento es un tratamiento térmico que induce la destrucción parcial o total de las células tumorales y/o del (de los) tumor(es). El tratamiento térmico se genera por la aplicación de un campo magnético alterno. Este campo magnético induce la producción de calor por las cadenas de magnetosomas (encapsuladas o no en una vesícula).
- En una realización, el campo magnético alterno aplicado durante el tratamiento se caracteriza por una frecuencia que se encuentra entre aproximadamente  $50\text{ kHz}$  y aproximadamente  $1000\text{ kHz}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $100\text{ kHz}$  y aproximadamente  $500\text{ kHz}$ , más preferiblemente entre aproximadamente  $100\text{ kHz}$  y aproximadamente  $200\text{ kHz}$ .
- En otra realización, el campo magnético se caracteriza por una fuerza que se encuentra entre aproximadamente  $0,1\text{ mT}$  y aproximadamente  $200\text{ mT}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $1\text{ mT}$  y aproximadamente  $100\text{ mT}$ , más preferiblemente entre aproximadamente  $10\text{ mT}$  y aproximadamente  $60\text{ mT}$ , típicamente entre aproximadamente  $10\text{ mT}$  y aproximadamente  $50\text{ mT}$ .
- El valor máximo de fuerza del campo magnético se determina por el valor al que se vuelve tóxico para el organismo (concretamente, esencialmente cuando genera corrientes de Foucault). Puede ser posible usar campos magnéticos de fuerzas mayores de  $200\text{ mT}$  en la terapia si se muestra que no son tóxicos.
- En otra realización, el tratamiento se caracteriza por el periodo de tiempo durante el cual se aplica el campo magnético. Este periodo de tiempo puede estar entre aproximadamente  $1\text{ segundo}$  y aproximadamente  $6\text{ horas}$ , preferiblemente entre aproximadamente  $1\text{ minuto}$  y aproximadamente  $1\text{ hora}$ , lo más preferiblemente entre  $1\text{ minuto}$  y  $30\text{ minutos}$ .
- Se aplica preferiblemente el tratamiento térmico a pacientes anestesiados. Por lo tanto, el tiempo durante el cual se lleva a cabo el tratamiento puede ser menor o igual al periodo de tiempo de la anestesia. Por tanto, un tratamiento térmico puede llevarse a cabo potencialmente durante más de  $6\text{ horas}$ , por ejemplo si el paciente se anestesia durante más de  $6\text{ horas}$ .
- En otra realización, el tratamiento se caracteriza por la cantidad de magnetosomas usados durante la terapia. Esta cantidad de magnetosomas está relacionada con la cantidad de óxido de hierro contenida en la suspensión de cadenas de magnetosomas. Esta cantidad se estima midiendo la cantidad de óxido de hierro presente en la suspensión de cadenas de magnetosomas que se inyecta. Se encuentra entre aproximadamente  $0,001\text{ mg}$  y aproximadamente  $100\text{ mg}$  de óxido de hierro, preferiblemente entre aproximadamente  $0,01\text{ mg}$  y aproximadamente  $100\text{ mg}$  de óxido de hierro, más preferiblemente entre aproximadamente  $0,01\text{ mg}$  y aproximadamente  $10\text{ mg}$  de óxido de hierro, más preferiblemente entre  $0,1\text{ mg}$  y  $10\text{ mg}$  de óxido de hierro, típicamente entre  $0,1\text{ mg}$  y  $1\text{ mg}$  de óxido de hierro. La cantidad de magnetosomas que tienen que inyectarse depende esencialmente del volumen del tumor tratado, de la temperatura requerida durante el tratamiento y del método de inyección. Un volumen tumoral alto y una temperatura tumoral alta requieren administrar una alta cantidad de magnetosomas. Además, si los magnetosomas se administran por vía intravenosa (o de otro modo desde el exterior de la(s) localización(es) del tumor, podrían necesitarse más cadenas de magnetosomas que si se administran directamente en o cerca del (de los) tumor(es).

- En otra realización, la administración de las cadenas de magnetosomas puede llevarse a cabo a diferente velocidad dependiendo del (de los) tumor(es) diana y de la concentración de la suspensión de cadenas de magnetosomas administrada. Por ejemplo, la administración de la suspensión de cadenas de magnetosomas directamente en tumor(es) cerebral(es) podría requerir una velocidad de inyección más lenta que la inyección intravenosa o que una inyección en un tumor localizado en la superficie cutánea. La inyección de una suspensión más concentrada de cadenas de magnetosomas podría requerir una velocidad de inyección más lenta que la de una suspensión menos concentrada de cadena de magnetosomas. La velocidad de inyección se encuentra preferiblemente entre 0,1 µl/min y 1 l/min, más preferiblemente entre 1 µl/min y 100 ml/min, lo más preferiblemente entre 1 µl/min y 10 ml/min, en que el volumen indicado es el volumen de la suspensión de cadenas de magnetosomas administradas.
- En otra realización, la concentración de la suspensión de cadenas de magnetosomas se encuentra típicamente entre 1 µg/ml y 100 mg/ml, preferiblemente entre 10 µg/ml y 50 mg/ml, en que esta concentración representa la cantidad de óxido de hierro (de preferencia maghemita) contenida en la suspensión. En otra realización, las cadenas de magnetosomas se mezclan con un disolvente que estabiliza las cadenas de magnetosomas. El pH de la suspensión puede ajustarse y/o pueden añadirse cationes y/o aniones a la suspensión que contiene las cadenas de magnetosomas para estabilizar esta suspensión.
- En otra realización, se repite la administración de las cadenas de magnetosomas al paciente. El número de repeticiones depende de la cantidad de magnetosomas que se administra de una vez. Si se administra de una vez solo una pequeña cantidad de cadenas de magnetosomas, la etapa de administración podría repetirse varias veces hasta administrar la cantidad deseada de magnetosomas a un paciente.
- En otra realización, se repite el tratamiento térmico iniciado por la aplicación del campo magnético alterno. Los tratamientos térmicos sucesivos aplicados después de la administración de una cantidad dada de cadenas de magnetosomas se denominan un ciclo térmico. La cantidad dada de magnetosomas usada para cada ciclo térmico puede administrarse mediante una sola administración o mediante varias administraciones sucesivas como se explica anteriormente. Los diferentes tratamientos térmicos en un ciclo térmico se separan entre sí por un tiempo de reposo. El tiempo de reposo puede ser igual a 1 segundo o mayor de 1 segundo, preferiblemente igual a 1 minuto o mayor de 1 minuto, más preferiblemente igual a 10 minutos o mayor de 10 minutos, preferiblemente mayor o igual a 30 minutos.
- En una realización, los diferentes tratamientos térmicos en un ciclo térmico se separan entre sí por un tiempo de reposo mayor de lo mencionado anteriormente. Este tiempo de reposo puede encontrarse entre aproximadamente 1 y 15 días.
- En una realización, el ciclo térmico se repite de 1 a 648.000 veces, en particular de 1 a 1.000 veces, más particularmente de 1 a 100 veces, típicamente de 1 a 10 veces. El tasa de repetición máxima de 648.000 veces se estima suponiendo que el tratamiento se lleva a cabo durante un tiempo muy corto, típicamente de aproximadamente 1 segundo, durante 15 días con un tiempo de descanso muy corto, típicamente de aproximadamente 1 segundo de tiempo de reposo que separa cada tratamiento. El número de repeticiones del tratamiento depende del periodo de tiempo del tratamiento. De preferencia, cuanto más largo es el tratamiento menos repeticiones necesita a condición que los otros parámetros de la terapia (tales como la fuerza o frecuencia del campo magnético aplicado) sean fijos.
- Según la invención, una cesión incluye las secuencias de administrar una cantidad dada de cadenas de magnetosomas a un paciente y la generación de calor mediante la aplicación del campo magnético (así como otras secuencias opcionales como se describen a continuación en la presente memoria). Pueden llevarse a cabo diferentes cesiones en el mismo paciente. Estas cesiones pueden separarse entre sí por un periodo de tiempo que sea suficientemente largo. Este periodo de tiempo puede ser igual a 1 día o mayor de 1 día, preferiblemente igual a 15 días o mayor de 15 días, más preferiblemente igual a 1 mes o mayor de 1 mes.
- Para optimizar la eficacia de la termoterapia, necesitan ajustarse los siguientes parámetros, concretamente la cantidad de cadenas de magnetosomas usadas durante la terapia, la frecuencia y/o fuerza del campo magnético aplicado, el periodo de tiempo del tratamiento, el número de veces que se repite el tratamiento durante una "cesión" y el número de "cesiones". Estos parámetros pueden depender de propiedades específicas del tumor diana, concretamente por ejemplo de su tamaño, resistencia a la termoterapia y viscosidad. Para un tumor con un gran volumen y/o alta resistencia a la temperatura y/o alta viscosidad, podría considerarse aumentar la cantidad de magnetosomas inyectados y/o la fuerza/frecuencia del campo magnético aplicado y/o el número de repeticiones del tratamiento. En este caso, podría considerarse también encapsular los magnetosomas bacterianos en una vesícula para favorecer la producción de calor. En una realización, los parámetros de la termoterapia se ajustan para optimizar la eficacia del tratamiento del tumor para tratar.
- En aún otra realización, los valores de estos parámetros dependen también del número de tumores y de la presencia de metástasis que tienen que tratarse. Para un paciente en estado de cáncer avanzado, concretamente con metástasis y/o un número importante de tumores, la cantidad de cadenas de magnetosomas necesarias será mayor que para un solo tumor. En lugar de aumentar la cantidad de magnetosomas, podría considerarse también aumentar el periodo de tiempo del tratamiento, la fuerza del campo magnético aplicado durante el tratamiento (para alcanzar

mayores temperaturas) o el número de veces que se repite el tratamiento.

El tratamiento pretende tratar cánceres, más preferiblemente tumores sólidos. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse con este tipo de termoterapia incluyen cáncer de próstata (Kawai *et al.*, Prostate, 2008, 68, 784-792), cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de mama (Kikumori *et al.*, Breast Cancer Res. Treat., 2009, 113, 435441), cáncer de cerebro (Thiesen *et al.*, Int. J. Hyperthermia, 2008, 24, 467-474) y cáncer cutáneo (Ito *et al.*, Cancer Sci., 2003, 94, 308-313).

Es otro objeto de la invención un método en el que las bacterias magnetotácticas se cultivan en un medio de crecimiento que contiene al menos una fuente de hierro, tal como una solución de quinato de hierro, y un agente quelante como se define en la misma. Como ejemplo, el medio de crecimiento contiene los ingredientes mencionados en el ejemplo 1. Estos aditivos producen en condiciones específicas un aumento de los tamaños de los magnetosomas y/o de la longitud de las cadenas de magnetosomas. Por consiguiente, potencian la capacidad de calentamiento de las cadenas de magnetosomas cuando se exponen a un campo magnético alterno.

Se da a conocer también un método para la producción de cadenas de magnetosomas, en el que las bacterias magnetotácticas se cultivan en un medio de crecimiento que contiene el medio de crecimiento estándar de bacterias magnetotácticas, tal como se describe en el ejemplo 1 para la especie AMB-1, y un aditivo que es un metal de transición, tal como por ejemplo cobalto, níquel, cobre, cinc, manganeso, cromo o una mezcla de dos o más de estos metales.

En este método dado a conocer, se lleva a cabo el dopaje de los magnetosomas con un metal de transición, p.ej. cobalto, añadiendo una disolución de metal de transición (p.ej. cobalto) de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, preferiblemente de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente de aproximadamente 2  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  al medio de crecimiento de las bacterias magnetotácticas. Dicha disolución podría ser, por ejemplo, una disolución de quinato de cobalto añadida al medio de crecimiento estándar de las bacterias magnetotácticas, p.ej. de la especie AMB-1 (ATCC 70027), siguiendo el mismo método que se usa por Staniland *et al.* (S. Staniland *et al.*, Nature Nanotech., 2008, 3, 158-162). Las bacterias magnetotácticas sintetizadas en presencia de cobalto, p.ej. quinato de cobalto u otro metal de transición, poseen propiedades magnéticas mejoradas incluso cuando el porcentaje de dopaje de cobalto es menor del 2 % (S. Staniland *et al.*, Nature Nanotech., 2008, 3, 158-162). En el estudio anterior de Staniland *et al.*, se observó el cambio de las propiedades magnéticas en presencia de cobalto para las bacterias magnetotácticas enteras y no para las cadenas de magnetosomas extraídas de las bacterias magnetotácticas. La mejora de las propiedades magnéticas de los magnetosomas dopados con Co dispuestos en cadenas y extraídos de las bacterias magnetotácticas, suministrando una capacidad de calentamiento mejorada, es una contribución de esta invención. Para nanopartículas sintetizadas químicamente, es habitualmente necesario un porcentaje de dopaje de Co mayor de aproximadamente un 10 % para observar cambios grandes de las propiedades magnéticas (A. Franco *et al.*, J. Mag. Mag. Mat., 2008, 320, 709-713; R. Tackett *et al.*, J. Mag. Mag. Mat., 2008, 320, 2755-2759). Esto indica que los magnetosomas dopados con Co podrían mejorar la capacidad de calentamiento en comparación con magnetosomas no dopados incluso para un bajo porcentaje de dopaje de cobalto.

En el método para la producción de cadenas de magnetosomas de la invención, se cultivan las bacterias magnetotácticas en presencia de un agente quelante. Sin estar explicado totalmente por la teoría, se cree que los agentes quelantes se unen a los cationes derivados de hierro o cualquiera de los otros metales de transición usados como aditivos, y por consiguiente mejoran la penetración del hierro y/u otro metal de transición en las bacterias magnetotácticas. Este proceso suministra magnetosomas con propiedades de calentamiento mejoradas.

En una realización, se añade al medio de crecimiento una suspensión que contiene de aproximadamente 0,02  $\mu\text{M}$  a 1 mM, preferiblemente de 0,02  $\mu\text{M}$  a 400  $\mu\text{M}$ , preferiblemente de 0,02  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$ , preferiblemente de 1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , lo más preferiblemente de 2  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ , de un agente quelante de hierro.

En una realización, el agente quelante es una molécula que contiene uno o varios grupos funcionales de ácido carboxílico tales como ALA (ácido  $\alpha$ -lipoico), calceína, carboxifluoresceína, deferasirox, ácido dipicolínico, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), EDTA (ácido etilendiamonotetraacético), ácido fólico o vitamina B9, ácido láctico, rodamina B, carboximetildextrano (polímeros), ácido dipicolínico o ácido oxálico, ácido cítrico o grupos funcionales citrato, tales como BAPTA (ácido aminofenoxietanotetraacético), CDTA (ácido ciclohexano-1,2-diaminotetraacético), EDDHMA (ácido etilendiaminodi-(o-hidroxip-metilfenil)acético),  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ , EDTCA (ácido etilendiaminotetraacético más Cetavlon, un tensioactivo de amonio), EDDA (ácido etilendiamino-*N,N'*-diacético), EDDHA (ácido etilendiamino-*N,N'*-bis(2-hidroxifenil)acético), EGTA (ácido etilenglicolbis( $\beta$ -aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético), HEDTA (ácido *N*-(2-hidroxietil)etilenaminotriacético), HEEDTA (ácido hidroxil-2-etilendiaminotriacético), NTA (triacetato de nitrilo) o ácido fenólico.

En otra realización, el agente quelante es una molécula que contiene uno o varios grupos funcionales alcohol, tales como catecol o sus derivados, o uno o varios grupos funcionales aminoalcohol, tales como dopamina, deferiprona, deferroxamina, desferrioxamina, o uno o varios grupos funcionales ácido aminocarboxílico o cetona tales como doxorubicina, cafeína, D-penicilamina, pirroloquinolina, HEIDA (ácido hidroxietilimino-*N,N'*-dietanoico).



En una realización, el agente quelante es una molécula que contiene un grupo funcional fosfonato o ácido fosfónico, tal como AEPN (ácido 2-aminoetilfosfónico), AMP (ácido aminotris(metilenfosfónico)), ATMP (ácido aminotris(metilenfosfónico)), CEPA (ácido 2-carboxietilfosfónico), DMMP (metilfosfonato de dimetilo), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)), EDTMP (ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico)), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico), HDTMP (ácido hexametilendiaminotetra(metilenfosfónico)), HPAA (ácido 2-hidroxifosfonocarboxílico), PBTC (ácido fosfonobutanotricarboxílico), PMIDA (ácido *N*-(fosfonometil)iminodiacético), TDTMP (ácido tetrametilendiaminotetra(metilenfosfónico)), ADP (ácido adenosindifosfórico) o 1-{12-[4-(difluoruro de dipirrometenoboro)butanoil]amino}dodecanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato, una sal de sodio del ácido L- $\alpha$ -fosfatídico o una sal de sodio de 1-palmitoil-2-(difluoruro de dipirrometenoboro)undecanoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina).

En otra realización, el agente quelante es una molécula que contiene un grupo funcional bis, tris o tetrafosfonato o ácido bis, tris o tetrafosfónico, tal como ácido 1-hidroximetilenbisfosfónico, ácido propanotrisfosfónico, ácido (nitrilotris(metilen))trisfosfónico, (ácido fosfinilidintris(metilen))trisfosfónico. Los ejemplos de ácidos 1-hidroximetilenbisfosfónicos incluyen ácido alendrónico (Fosamax<sup>TM</sup>), ácido pamidrónico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido neridrónico, ácido ibandrónico (Bondronat<sup>TM</sup>), ácido minodrónico y otros compuestos descritos en la bibliografía (L. Wilder *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 3721-3728; M. Neves, *N. Med. Biol.*, 2002, 29, 329-338; H. Shinoda *et al.*, *Calcif. Tissue Int.*, 1983, 35, 87-89; M. A. Merrel, *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, 570, 27-37). Para ácido neridrónico, ácido alendrónico y ácido residrónico 0,4  $\mu$ M o 4  $\mu$ M introducidos en el medio de crecimiento bacteriano, se ha observado en la presente memoria que el porcentaje de magnetosomas mayores de 45 nm se vuelve mayor que para los magnetosomas sintetizados en ausencia de ácido bisfosfónico. Las cadenas de magnetosomas sintetizadas en estas condiciones poseen por consiguiente propiedades de calentamiento mejoradas.

En otra realización, el agente quelante es una molécula que contiene un grupo funcional sulfonato o ácido sulfónico o BAL (dimercaprol) tal como BPDS (disulfonato de batofenantrolina o 4,7-di(4-fenilsulfonato)-1,10-fenantrolina), DMPS (sulfonato de dimercaptopropano o ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico), sulforrodamina 101 o DMSA (ácido dimercaptosuccínico).

Son otros ejemplos de agentes quelantes ligandos polidentados, por ejemplo hemoglobina, clorofila, porfirina y compuestos orgánicos que contienen anillos pirrólicos.

En otra realización, las bacterias magnetotácticas se cultivan en un medio de crecimiento que contiene tanto un agente quelante como un metal de transición.

En una realización preferida, se usa cobalto como metal de transición, usado preferiblemente en combinación con un agente quelante seleccionado de un ácido bisfosfónico (ácido neridrónico, ácido alendrónico o ácido risedrónico), rodamina o EDTA.

En la presente invención, el tratamiento comprende las siguientes etapas de:

- (i) proporcionar a un mamífero cadenas de magnetosomas;
- (ii) opcionalmente, direccionar las cadenas de magnetosomas hacia el tejido, tumor(es) y/o células tumorales para tratar;
- (iii) opcionalmente, detectar las cadenas de magnetosomas en el tejido, tumor(es) y/o células tumorales para tratar;
- (iv) calentar mediante la aplicación de un campo magnético alterno;
- (v) opcionalmente, retirar las cadenas de magnetosomas del tejido, tumor(es), células tumorales y/o del cuerpo.

En todas las siguientes realizaciones y realizaciones preferidas, las cadenas de magnetosomas puede encapsularse en una vesícula o no.

Las etapas (iii) y (iv) podrían llevarse a cabo también en cualquier orden, por ejemplo:

- etapa (iii) y después etapa (iv); o
- etapa (iv) y después etapa (iii).

Las etapas (ii), (iii) y (iv) podrían llevarse a cabo simultánea o consecutivamente.

Las etapas (ii) y (iv) podrían llevarse a cabo simultáneamente.

Las etapas (iii) y (iv) podrían llevarse a cabo simultáneamente.

Se entiende que mamífero significa cualquier mamífero, incluyendo también seres humanos.

En una realización, las cadenas de magnetosomas de la etapa (i) podrían ser cadenas de magnetosomas existentes en el cuerpo, por ejemplo aquellas permanecientes después de un primer ciclo de tratamiento.

En otra realización, la etapa (i) podía estar precedida por una etapa (i') de administración de las cadenas de magnetosomas a un mamífero.

- 5 En una realización, se lleva a cabo la etapa (i') de tal modo que las cadenas de magnetosomas se administren lejos de las células o tejido para tratar. Por ejemplo, se inyectan por vía intravenosa en la sangre o se administran en otro órgano que el que contiene el tumor.

En una realización, se lleva a cabo la etapa (i') de tal modo que las cadenas de magnetosomas se administren cerca de las células o tejidos para tratar.

- 10 En aún otra realización, se lleva a cabo la etapa (i') de tal modo que las cadenas de magnetosomas se administren a las células y/o tumor(es) para tratar.

La distancia entre la zona de administración de la suspensión de cadenas de magnetosomas y la localización del tumor puede variar dependiendo de si es posible o no inyectar directamente los magnetosomas en el (los) tumor(es). Por ejemplo, el (los) tumores podrían localizarse demasiado cerca de un órgano vital. En este caso, la inyección directa de las cadenas de magnetosomas en el (los) tumor(es) no sería posible.

- 15

El tratamiento puede contener también una segunda etapa de direccionamiento hacia las células tumorales o tumor(es) para tratar. Esta etapa es particularmente importante si la administración de las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) no se lleva a cabo directamente en el tumor. Este es a menudo el caso cuando el tipo de inyección elegida es intravenoso. El objetivo de la etapa de direccionamiento es colocar las cadenas de magnetosomas en el entorno de las células tumorales y/o del (de los) tumor(es) y/o en las células tumorales y/o tumor(es).

- 20

En una realización, se lleva a cabo la etapa de direccionamiento usando un campo magnético que guía las cadenas de magnetosomas (encapsuladas o no en una vesícula) al entorno de las células tumorales y/o el (los) tumor(es) y/o a las células tumorales y/o tumor(es). Este tipo de direccionamiento se designa como direccionamiento magnético.

- 25 En aún otra realización, pueden seguirse dos enfoques diferentes para guiar las cadenas de magnetosomas magnéticamente al entorno del (de los) tumor(es) y/o al (a los) tumor(es) mismo(s). Por un lado, se aplica un campo magnético fuera del cuerpo de un paciente y se ajusta su orientación para posibilitar que las cadenas de magnetosomas sigan el camino correcto hasta que alcanzan la localización del tumor. Este tipo de direccionamiento magnético se designa como direccionamiento "activo" puesto que puede necesitarse cambiar y ajustar las características del campo magnético aplicado durante la etapa de direccionamiento. Podría usarse para esta etapa de direccionamiento un instrumento de IRM adaptado en el que puedan orientarse el paciente o el campo magnético en cualquier dirección. Por otro lado, podría colocarse un imán cerca o en la localización del tumor para atraer las cadenas de magnetosomas al tumor y/o al entorno del tumor. En este caso, el direccionamiento magnético sería esencialmente pasivo (concretamente, se esperaría esencialmente a la acumulación de las cadenas de magnetosomas en el (los) tumor(es) y/o entorno del tumor).

- 30

En otra realización, se realiza la etapa de direccionamiento hacia el (los) tumor(es) ligando una molécula directora biológica y/o química que direcciona hacia el (los) tumor(es) las cadenas de magnetosomas o la vesícula que contiene las cadenas de magnetosomas. Esta molécula directora es tal que reconoce específicamente las células tumorales. Este tipo de direccionamiento se designa como direccionamiento molecular.

- 40 En una realización, esta molécula directora es un anticuerpo que reconoce específicamente las células tumorales.

En otra realización, se usa PEG o ácido fólico como molécula directora.

En una realización, se realiza el recubrimiento de la superficie de las cadenas de magnetosomas o de la vesícula que contiene las cadenas de magnetosomas usando polietilenglicol PEG y/o ácido fólico, y/o un anticuerpo. La presencia de estas moléculas puede no solo posibilitar direccionar hacia células específicas, sino también favorecer la captación intracelular y/o posibilitar evitar el reconocimiento de las cadenas de magnetosomas por macrófagos (Allen *et al.*, Trends in Pharmacological Sciences 1994, 15, 215-220; Blume *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1990, 1029, 91-97; Gabizon *et al.*, Biochim. et Biophys. Acta, 1992, 1103, 94-100; Zhang *et al.*, Biomaterials 2002, 23, 1553-1561).

- 45

La etapa de direccionar el(los) tumor(es) podría realizarse usando una combinación de ambas de las técnicas mencionadas anteriormente

- 50

- direccionamiento magnético;
- direccionamiento molecular; o
- direccionamiento magnético y direccionamiento molecular.

- En una realización, el método de detección de los magnetosomas bacterianos en el organismo (concretamente, en el tumor o en otra parte) usa IRM u otra técnica tal como fluorescencia. Dicha técnica se usa para verificar que las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) han alcanzado el sitio de interés antes de iniciar el tratamiento inducido por calor y/o para verificar que las cadenas de magnetosomas están en camino para 5 direccionarse hacia el tumor y/o para verificar que se eliminan apropiadamente y/o para verificar que se han administrado exitosamente.
- En una realización muy interesante, el campo magnético, y especialmente el campo magnético usado para el calentamiento, se usa para internalizar o mejorar la internalización de las cadenas de magnetosomas en las células tumorales.
- 10 También es posible, cuando las cadenas de magnetosomas están en el tumor o en las células tumorales, usar el campo magnético como “enfoque final” para ajustar la posición de las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) en el tumor para alcanzar la eficacia de calentamiento y/o actividad antitumoral máxima durante el tratamiento inducido por calor.
- En aún otra realización, se detectan las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) por IRM. Se ha demostrado la detección de bacterias magnetotáticas enteras por IRM (R. Benoit *et al.*, Clin. Cancer. Res. 2009, 15, 5170-5177). Esta realización se refiere a la detección de las cadenas de magnetosomas.
- 15 En una realización, se usan las cadenas de magnetosomas como agentes de contraste que pueden detectarse fácilmente por IRM debido a sus propiedades específicas (composición de óxido de hierro y/o buena cristalinidad).
- En aún otra realización, se detectan las cadenas de magnetosomas usando una técnica de detección de fluorescencia. En este caso, se modifican las cadenas de magnetosomas mediante la presencia de una molécula fluorescente o marcador fluorescente, que se coloca en la superficie y/o cerca de la superficie y/o en uno o varios de los magnetosomas bacterianos pertenecientes a las cadenas de magnetosomas. Dicha molécula fluorescente podría ser rodamina, calceína, fluorosceína, bromuro de etidio, proteína fluorescente verde o amarilla, cumarina, cianina o derivados de estas moléculas enumeradas.
- 20 En otra realización, las moléculas fluorescentes se colocan en los magnetosomas, en su superficie o cerca de su superficie, cultivando las bacterias magnetotáticas en presencia de estas moléculas fluorescentes. Por ejemplo, se obtienen magnetosomas fluorescentes cultivando las bacterias magnetotáticas en presencia de una solución aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM de moléculas fluorescentes. Pueden obtenerse magnetosomas fluorescentes, por ejemplo, cultivando las bacterias magnetotáticas en presencia de una solución aproximadamente 40  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 400 de rodamina.
- 25 En otra realización, las moléculas fluorescentes se unen a las cadenas de magnetosomas. Esto puede hacerse ligando químicamente las moléculas fluorescentes a la superficie de los magnetosomas.
- En aún otra realización, los magnetosomas tienen moléculas fluorescentes unidas en su superficie y contenidas dentro de ellos. Esto puede obtenerse usando ambas de las técnicas mencionadas anteriormente para producir los magnetosomas fluorescentes.
- 30 En aún otra realización, la vesícula que contiene los magnetosomas bacterianos se vuelve fluorescente ligando una molécula fluorescente a la superficie de la vesícula.
- En una realización, se excita y detecta la fluorescencia de las cadenas de magnetosomas usando un esquema de excitación/detección tal que está colocado fuera del organismo. Este tipo de esquema de excitación/detección se usaría si el tumor estuviera localizado cerca de la superficie cutánea. Por ejemplo, podría colocarse una fibra óptica justo por encima del tumor cerca de la superficie cutánea para excitar los magnetosomas modificados y recoger la luz emitida por ellos.
- 35 En otra realización, se lleva a cabo la excitación y/o detección de los magnetosomas modificados insertando en el organismo una pieza de equipo (tal como una fibra óptica) que alcance el tumor y/o el entorno tumoral y que sea capaz de excitar y/o detectar la fluorescencia de los magnetosomas modificados.
- 40 En una realización, la etapa (v) es una etapa de retirada de los magnetosomas del tejido, tumor(es), células tumorales y/o del cuerpo. Se usa una técnica que guía las cadenas de magnetosomas fuera del organismo. Los magnetosomas bacterianos se retiran directamente del (de los) tumor(es) (por ejemplo quirúrgicamente haciendo un orificio que proporciona un camino para que los magnetosomas bacterianos dejen la localización del tumor y alcancen el exterior del organismo). Los magnetosomas bacterianos podrían retirarse también de la localización del tumor y llevarse hacia otros órganos tales como el hígado para eliminarse del cuerpo.
- 45 En aún otra realización, la técnica descrita en la realización anterior usa un campo magnético que lleva los magnetosomas fuera del (de los) tumor(es) y del cuerpo.
- En aún otra realización, se lleva a cabo la retirada de las cadenas de magnetosomas de la localización del tumor

ajustando la superficie de carga de las cadenas de magnetosomas.

En aún otra realización, las cadenas de magnetosomas están cargadas negativamente.

En una realización, el fluoróforo es también un agente quelante y se usa como aditivo durante el crecimiento de las bacterias magnetotácticas y la producción de magnetosomas. En una realización preferida, se usa rodamina como agente quelante y fluoróforo.

El tratamiento contiene entonces el tratamiento térmico *per se* como se describe anteriormente. Este tratamiento posibilita por tanto un tratamiento localizado de tumores y/o células tumorales y minimiza la destrucción de células sanas. Por lo tanto, proporciona una mejora en comparación con la quimioterapia u otras técnicas de tratamiento del cáncer, que habitualmente no se dirigen hacia ni destruyen específicamente células tumorales.

En otra realización, se combina el tratamiento térmico con quimioterapia.

Dicha combinación de dos tratamientos puede llevarse a cabo encapsulando las cadenas de magnetosomas en una vesícula, preferiblemente una vesícula lipídica, en presencia de un principio activo que es una sustancia antitumoral o anticancerosa. En este caso, los lípidos que forman las vesículas se caracterizan por una temperatura de transición de fase (la temperatura a la que los lípidos que forman la vesícula pierden su organización bicapa) que se encuentra entre 20 y 60°C. Se libera el principio activo en las células tumorales o en los tumores o en el entorno de las células tumorales o en el entorno de los tumores calentando las cadenas de magnetosomas y por ello la vesícula bajo la aplicación de un campo magnético alterno.

Son también objeto de la presente invención las vesículas según la invención, especialmente vesículas lipídicas que contienen las cadenas de magnetosomas y posiblemente un principio activo según la invención.

También es posible llevar a cabo el tratamiento en combinación con rayos X y/o radioterapia y/o quimioterapia y/o operación quirúrgica y/u otro tipo de tratamiento del cáncer.

En una realización, se lleva a cabo una operación quirúrgica para retirar parcial o totalmente el (los) tumor(es) y/o el entorno del (de los) tumor(es). Se administra la suspensión de cadenas de magnetosomas a la cavidad que queda después de la operación quirúrgica y se inicia la termoterapia aplicando un campo magnético externo. En este caso, se usa la termoterapia para destruir parte del (de los) tumor(es) que no pudieron retirarse durante la operación quirúrgica y/o para prevenir que el tumor crezca de nuevo después de la operación quirúrgica.

En aún otra realización, se crea una cavidad durante la operación quirúrgica en el tumor y/o entorno tumoral para crear un entorno más favorable para la producción de calor por las cadenas de magnetosomas que el tejido tumoral (concretamente por ejemplo, un entorno menos viscoso). En esta realización, se administran las cadenas de magnetosomas a esta cavidad.

La invención se refiere también al uso de cadenas de magnetosomas y/o de vesículas que contienen las cadenas de magnetosomas como se describen anteriormente como medio de calentamiento, especialmente de un tejido vivo o células vivas *in vivo*.

La invención se refiere también al uso de cadenas de magnetosomas (encapsuladas o no en una vesícula) como fármaco, especialmente como fármaco para tratamiento antitumoral, especialmente para tratamiento térmico antitumoral.

En una realización, se usan las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) como fármaco que posibilita el tratamiento de tumor(es) y/o células tumorales mediante un método de calentamiento.

En estos usos, la vesícula puede contener un principio activo que es, por ejemplo, un fármaco antitumoral.

En una realización, se usan las vesículas que contienen las cadenas de magnetosomas, y opcionalmente el principio activo, como fármaco que permite el tratamiento de las células tumorales o del tumor mediante un método de calentamiento que induce la liberación del principio activo.

En otra realización, se usan las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) como fármaco activado por un dispositivo médico, que es el campo magnético alterno.

La invención se refiere también al uso de cadenas de magnetosomas y/o vesículas que contienen cadenas de magnetosomas y opcionalmente un principio activo como dispositivo médico, diseñado específicamente para el tratamiento de tumor(es) y/o células tumorales.

En una realización, se usan las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) como dispositivo médico que posibilita el tratamiento magnético de tumores o células tumorales.

En una realización, se usan las cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) como dispositivo médico que posibilita el calentamiento de tumores o células tumorales o su entorno.

En una realización, se combinan las cadenas de magnetosomas o vesícula que contiene las cadenas de magnetosomas con un principio activo y se usan como dispositivo médico que permite la provisión de un principio activo a los tumores, las células tumorales o su entorno.

5 Según un rasgo, se hace uso de un dispositivo usado para inducir la excitación magnética de las cadenas de magnetosomas para completar el dispositivo médico.

La invención se refiere también a un kit que contiene cadenas de magnetosomas (encapsuladas en una vesícula o no) y un dispositivo que es capaz de generar un campo magnético con los rasgos requeridos para el tratamiento de cáncer o tumores inducido por calor.

10 En una realización, se usan las vesículas pertenecientes al kit en combinación con un principio activo que está encapsulado en las vesículas.

La invención se describirá ahora con más detalle usando los siguientes ejemplos no limitantes.

Descripción de las figuras:

15 Figura 1: (a) Micrografía de microscopia electrónica de transmisión (MET) de una célula de *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1, en que las flechas indican la localización de las cadenas de magnetosomas; (b) micrografía de MET de las cadenas de magnetosomas extraídas de las bacterias; (c) micrografía de MET de magnetosomas individuales desprendidos de las cadenas; (d) micrografía de MET de nanopartículas sintetizadas químicamente (SPION@citrato); (e) medida de la carga en la superficie de las cadenas de magnetosomas (CM) y magnetosomas individuales (MI) en función del pH de la suspensión que contiene estos dos tipos de magnetosomas bacterianos; (f) espectros infrarrojos de las cadenas de magnetosomas (CM) y magnetosomas individuales (MI).

20 Figura 2: (a) Variación de la temperatura de una suspensión de células bacterianas magnetotácticas intactas en función del tiempo cuando se somete la suspensión a un campo magnético alterno (CMA) de frecuencia 108 kHz y amplitud de CMA de 23 mT. Las líneas corresponden a la suspensión de células en agua (suspensión) y en un gel de agarosa al 2 % (gel), respectivamente; (b) lo mismo que en (a) para una amplitud de CMA de 88 mT; (c) bucles de histéresis menor de las bacterias enteras medido a 23 mT (cuadrados) o 88 mT (histéresis); (d) tasa de absorción específica (TAE) de una suspensión de bacterias magnetotácticas contenidas en agua o en un gel en función de la amplitud de CMA. Pérdidas por histéresis medidas a partir del área de los bucles de histéresis menor de una suspensión de bacterias magnetotácticas contenida en un gel; (e) representaciones en gráficas de columnas del TAE de las células intactas medido a 23 mT y 88 mT. Los recuadros representan la contribución a los aumentos de temperatura observados debido a las pérdidas por histéresis.

30 Figura 3: Propiedades de las cadenas de magnetosomas extraídas de células de *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1. (a) Aumentos de la temperatura de las cadenas de magnetosomas en función del tiempo en presencia de un CMA de frecuencia 108 kHz y amplitud de CMA 23 mT. Las líneas indican la tasa de calentamiento de las cadenas de magnetosomas suspendidas en agua (solución) o en gel de agarosa al 2 % (gel) respectivamente; (b) lo mismo que en (a) para una amplitud de CMA de 88 mT; (c) bucles de histéresis menor de cadenas de magnetosomas a 23 mT (cuadrados) y 88 mT (línea); (d) TAE medida a partir de la pendiente a 22°C de la tasa de calentamiento de las cadenas de magnetosomas suspendidas en agua (suspensión) o en un gel (gel) en función de la amplitud del CMA. Pérdidas de histéresis medidas a partir del área de los bucles de histéresis menor de una suspensión de cadenas de magnetosomas contenidas en un gel (histéresis); (e) representaciones en gráficas de columnas de la TAE de las cadenas de magnetosomas medida a 23 mT y 88 mT. Los recuadros representan la contribución a los aumentos de temperatura observados resultantes de las pérdidas por histéresis y la rotación de las cadenas de magnetosomas, respectivamente.

45 Figura 4: Propiedades de los magnetosomas individuales extraídos de células de *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 y tratados adicionalmente con SDS y calor. (a) Aumento de la temperatura de magnetosomas individuales en función del tiempo cuando se aplica una CMA de frecuencia 108 kHz y amplitud 23 mT. Las líneas indican las variaciones de temperatura de los magnetosomas individuales suspendidos en agua (suspensión) o en un gel de agarosa al 2 % (gel), respectivamente; (b) lo mismo que en (a) para una amplitud de CMA de 88 mT; (c): bucles de histéresis menor de magnetosomas individuales medidos a 23 mT (cuadrados) y 88 mT (línea), (d) TAE medida a partir de la pendiente a 22°C de la tasa de calentamiento de los magnetosomas individuales contenidos en agua (suspensión) o en un gel (gel) en función de la amplitud del CMA. Pérdidas por histéresis medidas a partir del área de los bucles de histéresis menor de los magnetosomas individuales contenidos en un gel (histéresis); (e): representaciones en gráficas de columnas de la TAE de magnetosomas individuales medida a 23 y 88 mT. Los recuadros representan contribuciones a los aumentos observados de temperatura debido a las pérdidas por histéresis y la rotación de los magnetosomas individuales, respectivamente.

55 Figura 5: (a-c): Propiedades de las cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas que se han sintetizado en ausencia de agentes quelantes y/o metales de transición distintos de hierro. Histogramas que muestran la distribución de los tamaños de magnetosoma (a) y las longitudes de cadena de magnetosomas (b) de este tipo de magnetosomas. (c) Variación con el tiempo de la temperatura de una suspensión de este tipo de magnetosomas que contiene 406 µg/ml de maghemita cuando se expone esta suspensión a un campo magnético

alternio de frecuencia 183 kHz y una fuerza de campo magnético de 43 u 80 mT. (d-f): Propiedades de las cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas que se han sintetizado en presencia de EDTA 0,4  $\mu$ M. Histogramas que muestran la distribución de los tamaños de magnetosoma (d) y las longitudes de cadena de magnetosomas (e) de este tipo de magnetosomas. (f) Variación con el tiempo de la temperatura de una suspensión que contiene este tipo de magnetosomas con una concentración de 406  $\mu$ g/ml de maghemita cuando se expone esta suspensión a un campo magnético alternio de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo magnético de 43 u 80 mT.

Figura 6: (a) Variación en función del tiempo de la temperatura de varias suspensiones que contienen diferentes tipos de cadenas de magnetosomas sintetizados en presencia de diferentes agentes quelantes (EDTA 4  $\mu$ M, rodamina B 4  $\mu$ M, dopamina 4  $\mu$ M, alendronato 4  $\mu$ M) y 406  $\mu$ g de maghemita por mililitro cuando se someten estas suspensiones a un campo magnético alternio de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo de 43 u 80 mT. (b) Variación en función del tiempo de la temperatura de dos suspensiones que contienen magnetosomas no dopados y dopados con Co organizados en cadenas. La concentración de estas suspensiones es de 1,52 mg/ml y se exponen a un campo magnético alternio de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo de 80 mT.

Figura 7: Propiedades de células MDA-MB-231 suspendidas incubadas en ausencia o en presencia de cadenas extraídas de magnetosomas de diversas concentraciones ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\gamma\text{Fe}_{203}} < 1 \text{ mg/ml}$ , en que  $C_{\gamma\text{Fe}_{203}}$  representa la concentración de maghemita de las suspensiones) y expuestas a un campo magnético alternio de frecuencia 183 kHz y diversas fuerzas ( $0 \text{ mT} < B < 60 \text{ mT}$ , en que B representa la fuerza del campo magnético aplicado). (a): Porcentaje de células vivas MDA-MB-231 en función de la fuerza de campo magnético para una incubación de suspensiones de cadenas de magnetosomas de diversas concentraciones. (b)-(d): Variaciones de temperatura de suspensiones que contienen células MDA-MB-231 incubadas en ausencia o en presencia de cadenas de magnetosomas de diversas concentraciones ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\gamma\text{Fe}_{203}} < 1 \text{ mg/ml}$ ) cuando se aplica a estas suspensiones un campo magnético alternio de B = 20 mT, (b), B = 43 mT, (c), o B = 60 mT, (d).

Figura 8: (a)-(c): Porcentaje de células vivas adherentes MDA-MB-231 en función de la fuerza del campo magnético ( $0 \text{ mT} < B < 60 \text{ mT}$ ), que se aplica una vez durante 20 minutos. Se incuban las células durante 24 horas, D1, (a), 48 horas, D2, (b) o 72 horas, D3, (c) en ausencia o en presencia de las cadenas extraídas de magnetosomas de diversas concentraciones ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\gamma\text{Fe}_{203}} < 1 \text{ mg/ml}$ ). (d): Porcentaje de células vivas adherentes MDA-MB-231 en función de la fuerza de campo magnético ( $0 \text{ mT} < B < 60 \text{ mT}$ ), que se aplica dos veces durante 20 minutos. Se incuban las células durante 72 horas en ausencia o en presencia de las cadenas de magnetosomas extraídas de diversas concentraciones ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\gamma\text{Fe}_{203}} < 1 \text{ mg/ml}$ ).

Figura 9: (a-c) Porcentaje de inhibición de células MDA-MB-231 incubadas en presencia de cuatro suspensiones diferentes que contienen cadenas de magnetosomas (CM), magnetosomas individuales (MI), SPION cubiertas por iones de citrato (SPION@citrato) o SPION cubiertas por moléculas de PEG (SPION@PEG) en función de la concentración de maghemita de estas cuatro suspensiones. (d) Porcentaje de células que se vuelven magnéticas en función del tiempo de incubación cuando se incuban las cuatro suspensiones mencionadas anteriormente ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\gamma\text{Fe}_{203}} < 1 \text{ mg/ml}$ ) en presencia de células MDA-MB-231 y se aplica un campo magnético alternio de 183 kHz y una fuerza de 43 mT.

Figura 10: (a) Configuración experimental usada para tratar ratones. Contiene una fuente de alimentación EasyHeat de 10 kW de Ambrell, Soultz, Francia, equipada con una bobina de 6,7 cm de diámetro en que se aplica un CMA de diversas fuerzas (variables de 20 a 80 mT). Se coloca un ratón dentro de la bobina para tratamiento. (b) Diagrama esquemático que muestra el tumor calentado y la posición a lo largo del tumor, que se registra durante las medidas infrarrojas de la temperatura. (c)-(f): Estudio de ratones tratados con suspensiones de magnetosomas individuales (ratones 1 a 4). (c) Variaciones de las temperaturas tumoral y rectal cuando se aplica el campo magnético durante el tratamiento. Estas temperaturas se promedian entre los diferentes ratones tratados (ratones 1 a 3); (d) para un ratón que muestra un comportamiento típico, distribución de temperatura medida a lo largo del tumor tratado 10 min después de iniciar el tratamiento; (e) variación del volumen tumoral normalizado para el tumor en que se ha inyectado la suspensión de magnetosomas individuales (ratones 1 a 3). Se normalizan los volúmenes de los tumores al volumen del tumor en el momento del tratamiento; (f) lo mismo que en (e) para el denominado tumor de control en que se ha inyectado solo PBS. En el ratón 4, se inyectó la suspensión de magnetosomas individuales, pero no se aplicó campo magnético.

Figura 11: Estudio de los ratones tratados con magnetosomas individuales (ratones 1 a 4). (a) Fotografías del tumor tratado en el ratón 1 justo después del tratamiento (D0), 14 días después del tratamiento (D14) o 30 días después del tratamiento (D30). (b) Micrografía de un tejido tumoral recogido 30 días después del tratamiento en el ratón 2; (c) ampliación de una región de (b) que muestra la presencia de magnetosomas bacterianos (color azul o contraste oscuro); (d) ampliación de una región de (c) que muestra agregados de magnetosomas.

Figura 12: Estudio de los ratones tratados con suspensiones que contienen cadenas de magnetosomas (ratones 5 a 9). (a) Variaciones de las temperaturas tumoral y rectal cuando se aplica el campo magnético durante el tratamiento (ratones 5 a 8). La temperatura se promedia entre los diferentes ratones (ratones 5 a 8); (b) para un ratón que muestra un comportamiento típico, distribución de temperatura medida a lo largo del tumor tratado 10 min después del inicio del tratamiento; (c) evolución del volumen tumoral normalizado para el tumor en que se ha inyectado la suspensión que contiene las cadenas de magnetosomas. Se normaliza el volumen de tumor tratado al volumen de

tumor en el momento de tratamiento; (d) lo mismo que en (c) para el tumor de control en que se ha inyectado solo PBS. En el ratón 9, se ha inyectado la suspensión que contiene las cadenas de magnetosomas, pero no se ha aplicado campo magnético al ratón.

Figura 13: Estudio de los ratones tratados con suspensiones de cadenas de magnetosomas (ratones 5 a 9). (a) Fotografías del tumor tratado en el ratón 5 justo después del tratamiento (D0), 14 días después del tratamiento (D14) y 30 días después del tratamiento (D30). (b) Micrografía de un tejido tumoral recogido 30 días después del tratamiento en el ratón 5, que muestra la presencia de magnetosomas bacterianos (color azul o contraste oscuro); ampliación de (b). (d) Ampliación de (c) que muestra una célula con su núcleo rodeado por magnetosomas bacterianos.

Figura 14: (a), (c), (e), (g): Variaciones de las temperaturas tumoral y rectal cuando se administran suspensiones que contienen las cadenas estándares de magnetosomas (a), magnetosomas-EDTA (c), SPION@citrato (e) o SPION@PEG (g) al tumor y se aplica el campo magnético alternativo de frecuencia 183 kHz y fuerza 43 mT durante 20 minutos. Se repite el tratamiento 3 veces con 1 día de reposo entre los diferentes tratamientos. (b), (d), (f), (h): Variaciones del volumen tumoral normalizado (concretamente, el volumen tumoral medido del día 2 al día 30 después del tratamiento dividido entre el volumen tumoral medido durante el día de tratamiento) durante los días siguientes al tratamiento para las cadenas estándares de magnetosomas (b), magnetosomas-EDTA, (d), SPION@citrato (f) o SPION@PEG, (h). En (b), (d), (f) y (h), las barras de error son las desviaciones estándares estimadas teniendo en cuenta el volumen tumoral normalizado de cada ratón.

Figura 15: (a), (c), (e), (g): Fotografías de los ratones que mostraban la mejor actividad antitumoral 30 días después del tratamiento inducido por calor para el tratamiento llevado a cabo usando las cadenas estándares de magnetosomas (a), magnetosomas-EDTA, (c), SPION@citrato (e) o SPION@PEG (g). (b), (d), (f), (h): Variaciones del volumen tumoral normalizado durante los días después del tratamiento para los ratones que muestran la mejor actividad antitumoral y tratados con cadenas estándares de magnetosomas (b), magnetosomas-EDTA, (d), SPION@citrato (f) y SPION@PEG (h).

Figura 16: Porcentaje de nanopartículas en el tumor ((a), (c), (e), (g)) y en las heces ((b), (d), (f), (h)) en el momento de inyección (D0), 3 días después de la inyección (D3), 6 días después de la inyección (D6) y 14 días después de la inyección (D14) para la administración intratumoral de suspensiones que contienen cualquiera de cadena de magnetosomas (a), (b), magnetosomas individuales (c), (d), SPION@citrato (e), (f) y SPION@PEG (g), (h).

Figura 17: Histogramas que muestran las distribuciones de tamaño de magnetosoma para bacterias magnetotácticas sintetizadas en ausencia de ácido bisfosfónico (a), en presencia de risedronato 4  $\mu$ M (b) o en presencia de alendronato 4  $\mu$ M (c). Histogramas que muestran las distribuciones de longitud de cadena de magnetosomas para bacterias magnetotácticas sintetizadas en ausencia de ácido bisfosfónico (d), en presencia de risedronato 4  $\mu$ M (e) o en presencia de alendronato 4  $\mu$ M (f). Variaciones de las temperaturas en función del tiempo cuando se aplica un campo magnético alterno de fuerza 43 u 80 mT a una suspensión que contiene cadenas de magnetosomas sintetizados en ausencia de ácido bisfosfónico, (g), en presencia de risedronato 4  $\mu$ M, (h) o en presencia de alendronato 4  $\mu$ M (i).

Figura 18. Para el ratón tratado con SPION, evolución de la temperatura y tamaños tumorales (ratones 10 a 13). (a) Evolución de las temperaturas tumoral y rectal durante el tratamiento. La temperatura se promedia entre los diferentes ratones tratados (ratones 10 a 12); (b) para un ratón que muestra un comportamiento típico, distribución de temperatura medida a lo largo del tumor tratado 10 min después del inicio del tratamiento; (c) evolución del volumen tumoral normalizado en que se ha inyectado la suspensión de SPION@citrato (ratones 10 a 13). Se normaliza el volumen de tumor tratado al volumen de tumor en el momento del tratamiento; (d) lo mismo que en (c) para el tumor de control en el que se ha inyectado solo PBS. En el ratón 14, se ha inyectado la disolución de SPION, pero no se ha aplicado campo magnético al ratón.

Descripción de los ejemplos

Ejemplo 1:

*Preparación de los diferentes tipos de partículas usadas como fuentes de calentamiento:*

En este ejemplo, se describen los métodos según los cuales se prepararon los diferentes tipos de partículas usadas como fuentes de calentamiento. Estas partículas son partículas contenidas en bacterias magnetotácticas enteras, cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas, magnetosomas individuales extraídos de bacterias magnetotácticas y desprendidas de las cadenas por calor y tratamiento con SDS, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro sintetizadas químicamente cubiertas por iones de citrato (SPION@citrato) o nanopartículas sintetizadas químicamente comercialmente disponibles cubiertas por moléculas de PEG (SPION@PEG). Se adquirieron las SPION@PEG en la compañía alemana Micromod (nombre de producto: Nanomag®-D-spio, número de producto: 79-00-201).

Se usaron las SPION@citrato como nanopartículas estándares porque poseen tamaños similares a la mayoría de nanopartículas usadas para hipertermia magnética (véase, por ejemplo: Johannsen *et al.*, *European Urology* 2007,

52, 1653-1662 o las demás referencias enumeradas al inicio de esta solicitud de patente) y un recubrimiento químico que estabiliza las nanopartículas pero no debería producir actividad antitumoral. Se usaron también las SPION@PEG como nanopartículas estándares, puesto que están comercialmente disponibles y son iguales que aquellas usadas por el grupo de DeNardo para llevar a cabo hipertermia magnética (véase, por ejemplo: De Nardo *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 7087s-7092s). Se comparó la eficacia de las cadenas de magnetosomas en termoterapia con la de estos dos estándares (SPION@citrato y SPION@PEG).

Se adquirió *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 en la ATCC (ATCC 700274). Se hicieron crecer microanaeróbicamente las células a temperatura ambiente (~25°C) en cultivo líquido en medio MSGM revisado ligeramente modificado (medio ATCC 1653). En 1 litro, este medio de cultivo contiene 0,68 g de fosfato de potasio monobásico, 0,85 g de succinato de sodio, 0,57 g de tartrato de sodio, 0,083 g de acetato de sodio, 225 µl de resazurina al 0,2 %, 0,17 g de nitrato de sodio, 0,04 g de ácido L-ascórbico, 2 ml de una disolución de quinato de hierro disolviendo 0,19 g de ácido quínico y 0,29 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O en 100 ml de agua destilada. La disolución de minerales de Woolf contenía en 1 l de agua destilada 0,5 g de ácido nitrilotriacético (NTA, C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>6</sub>), 1,5 g de sulfato de magnesio HEPTA (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 1 g de cloruro de sodio, 0,5 g de sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), 100 mg de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 100 mg de nitrato de cobalto (CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O), 100 mg de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), 100 mg de sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 10 mg de sulfato de cobre hidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), 10 mg de sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado (AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O), 10 mg de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 10 mg de molibdato de sodio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), 2 mg de selenito de sodio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 10 mg de wolframato de sodio dihidratado (Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) y 20 mg de cloruro de níquel (NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Se preparó la disolución de vitaminas de Woolf disolviendo en 1 l de agua destilada 2,2 mg de ácido fólico (vitamina B9), 10,2 mg de piridoxina (vitamina B6), 5,2 mg de riboflavina (vitamina B2), 2,2 mg de biotina (vitamina H o B7), 5,2 mg de tiamina (vitamina B1), 5,2 mg de ácido nicotínico (vitamina B3 o PP), 5,2 mg de ácido pantoténico (vitamina B5), 0,4 mg de vitamina B12, 5,2 mg de ácido aminobenzoico, 5,2 mg de ácido tiótico y 900 mg de fosfato de potasio. Se ajustó el pH del medio de crecimiento a 6,85 usando una disolución de hidróxido de sodio 5 M. Se recogieron las células como se describe a continuación en fase estacionaria. La fase estacionaria apareció cuando el medio se redujo completamente, indicado por un cambio en la coloración del medio de crecimiento de rosa a incoloro.

Se prepararon tres tipos diferentes de muestras a partir de células enteras intactas de *M. magneticum*. Se recogieron las células en fase estacionaria mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante (medio de crecimiento gastado) y se resuspendieron las células en 3 ml de agua desionizada. Para suspensiones de células enteras intactas, esta muestra no se trató más. La micrografía de MET de la Figura 1(a) muestra una bacteria magnetotáctica AMB-1 típica que contiene varias cadenas de magnetosomas.

Para extraer las cadenas de magnetosomas, se recentrifugó 1 ml de suspensión celular, se resuspendió en Tris·HCl 10 mM (pH 7,4) y se sometió entonces a sonicación durante 120 min a 30 W para lisar las células que liberan las cadenas de magnetosomas. Se ensayaron también tiempos de sonicación de 60 y 180 min y posibilitaban extraer las cadenas de magnetosomas a partir de las bacterias. Para un tiempo de sonicación de menos de 60 min, no se lisaron todas las bacterias magnetotácticas, mientras que para un tiempo de sonicación de más de 180 min, empezó a observarse agregación debido a la presencia de magnetosomas individuales agregados.

Después de la sonicación, se separó magnéticamente la suspensión de cadenas de magnetosomas disponiendo un imán fuerte de neodimio (0,1-1 T) cerca del tubo donde se recogía el material magnético como sedimento. Se retiró el sobrenadante que contenía desechos celulares y otros materiales orgánicos. Se lavaron las cadenas de magnetosomas 10 veces con un tampón Tris·HCl 10 mM (pH 7,4) de este modo y se resuspendieron finalmente en agua estéril desionizada. Se muestra una agrupación típica de cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias enteras en la micrografía de MET de la Figura 1(b). Se midió la carga superficial de las cadenas de magnetosomas en función del pH usando medidas de dispersión dinámica de luz (NanoZetasizer, Malvern Instruments Ltd). A pH fisiológico, la Figura 1(e) muestra que la carga superficial de las cadenas de magnetosomas es negativa a -22 mV. Se llevaron a cabo las medidas de infrarrojo usando un Nicolet 380 FT IR Thermo Electro. Se registró también el espectro de absorción infrarroja de una suspensión de cadenas de magnetosomas. Mostró picos que surgen de los grupos funcionales ácido carboxílico, amina, amida y fosfato (P-O), revelando la presencia tanto de proteínas como de fosfolípidos en la suspensión de cadenas de magnetosomas. Este resultado sugiere que tanto la membrana que rodea los magnetosomas como el filamento que une entre sí los magnetosomas están presentes en esta muestra (D. Faivre *et al.*, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 4875-4898).

Se obtuvieron magnetosomas individuales (concretamente, magnetosomas que no están organizados en cadenas) calentando la suspensión de cadenas de magnetosomas durante 5 horas a 90°C en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1 % en agua desionizada para retirar la mayoría del material biológico que rodea los magnetosomas, concretamente la mayoría de la membrana de magnetosomas que rodea los magnetosomas y del citoesqueleto responsable del alineamiento de los magnetosomas en cada cadena (D. Faivre, *Chem. Rev.*, 2008, 108, 4875-4898). Se lavaron los magnetosomas individuales como se describe para las cadenas de magnetosomas y se resuspendieron en agua desionizada. La micrografía de MET de la Figura 1(c) muestra una agrupación típica de magnetosomas individuales. Los magnetosomas individuales poseen diferentes propiedades que las cadenas de magnetosomas. Forman una agrupación agregada de nanopartículas (Figura 1(c)). Poseen una carga superficial que depende en gran medida de su nivel de agregación. Cuando los magnetosomas individuales se someten a



sonicación y se dispersan en agua, poseen una carga superficial relativamente similar a las cadenas de magnetosomas a pH 7. Sin embargo, cuando agregan, los magnetosomas individuales poseen una carga positiva (10 mV a pH 7, Figura 1(e)). Los magnetosomas individuales están rodeados por ácido fosfolipídico (presencia del pico P-O en el espectro de absorción infrarrojo de la Figura 1(f)), pero no por proteínas (ausencia de amida en el espectro de absorción infrarrojo de la Figura 1(f)), sugiriendo que el biomaterial que rodea los magnetosomas no se ha retirado completamente, sino que se ha desnaturalizado suficientemente para suministrar magnetosomas individuales no organizados en cadenas.

Se prepararon nanopartículas sintetizadas químicamente (SPION@cittrato) siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Lalatonne *et al.*, *Phys. Rev. E*, 2005, 71, 011404-1, 011404-10). Para preparar partículas de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  no recubiertas, se añadió en primer lugar una disolución de base (dimetilamina) a una disolución acuosa micelar de dodecilsulfato ferroso ( $\text{Fe}(\text{DS})_2$ ) y se mezcló. Las concentraciones finales de reactantes eran  $1,3 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $8,5 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $\text{Fe}(\text{DS})_2$  y dimetilamina, respectivamente. Se agitó entonces vigorosamente la disolución durante 2 horas a  $28,5^\circ\text{C}$  y se aisló del sobrenadante el precipitado resultante de nanocristales no recubiertos por centrifugación. En la segunda etapa, se lavó el precipitado con una disolución ácida ( $\text{HNO}_3$ ,  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) hasta alcanzar una disolución de pH= 2. Se usó citrato de sodio disuelto en agua ( $[\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_5] = 1,5 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) para recubrir las nanopartículas. Se sometió la disolución a sonicación durante 2 horas a  $90^\circ\text{C}$  y la adición de acetona indujo la precipitación de nanocristales. Después de lavar con un gran exceso de acetona, se secó el precipitado al aire. Se dispersaron finalmente en agua los nanocristales recubiertos con iones de citrato. El pH, que era inicialmente ~2, aumentó progresivamente hasta 7,4 añadiendo disolución de hidróxido de sodio NaOH ( $10^{-1} \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Las SPION@cittrato están compuestas por maghemita y poseen un tamaño medio de ~10 nm. Se muestra en la Figura 1(d) una micrografía de MET de SPION@cittrato.

Pueden obtenerse las propiedades detalladas de las SPION@PEG de la compañía Micromod. Se indica en la hoja de información (nº de producto: 79-00-201) proporcionada por Micromod que las SPION@PEG poseen una magnetización de saturación de  $34 \text{ Am}^2/\text{kg}$ , un tamaño de aproximadamente 20 nm, una polidispersidad de menos de un 20 % y que son estables en tampón acuoso para pH > 4.

Ejemplo 2:

#### *Producción de calor por magnetosomas bacterianos expuestos a un campo magnético oscilante*

En este ejemplo, se proporciona un estudio detallado de los mecanismos de producción de calor por magnetosomas biomineralizados por bacterias magnetotácticas. Los valores de frecuencia de campo magnético (108 kHz) y amplitud de campo magnético (23 a 88 mT) usados para calentar las diferentes muestras se encuentran dentro del intervalo de los parámetros de campo magnético usados para llevar a cabo hipertermia de CMA (campo magnético alterno) de alta frecuencia y alta amplitud (Ivkov *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 7093s-7103s; De Nardo *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, 7087s-7092s; De Nardo *et al.*, *The J. Nucl. Med.*, 2007, 48, 437-444). Para hipertermia por CMA, las frecuencias de campo magnético recomendadas se encuentran entre 50 kHz y 1 MHz, mientras que la amplitud de campo magnético tiene que permanecer por debajo de 100 mT (Mornet *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 2161-2175). Se comparan las propiedades productoras de calor de los tres tipos diferentes de disposiciones de magnetosomas (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309; Alphandéry *et al.*, *ACS Nano*, 2009, 3, 1539-1547): 1) cadenas de magnetosomas contenidas en bacterias magnetotácticas AMB-1 intactas; 2) cadenas de magnetosomas extraídas de las bacterias que retenían sus membranas de magnetosoma y 3) cristales de magnetosomas individuales cuyas membranas de magnetosoma se han retirado en su mayor parte.

Es conocido que, para nanopartículas ferromagnéticas grandes, existen dos mecanismos productores de calor principales. El primero es debido a la rotación física de nanopartículas magnéticas en un campo magnético y el segundo es el resultado de las pérdidas por histéresis (Hergt *et al.*, *IEEE Trans. Mag.*, 1998, 34, 3745-3754). Para determinar cuál de estos mecanismos es responsable de la producción de calor por los tres tipos diferentes de disposiciones de magnetosomas mencionados anteriormente, se compararon las tasas de calentamiento de las muestras en agua, donde es posible la rotación de células y magnetosomas, con las presentes en un gel, cuya rotación está inhibida. De este modo, puede determinarse la cantidad de calor generada por la rotación de bacterias o magnetosomas y la que surge de las pérdidas por histéresis. Para verificar que el calor producido en el gel es debido a pérdidas por histéresis, se midieron las pérdidas por histéresis independientemente usando medidas magnéticas.

Materiales y métodos:

Se examinaron las muestras usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokio) operativo a 100 kV. Se depositaron 5  $\mu\text{l}$  de una disolución que contenía  $2 \times 10^{-4} \%$  en peso de magnetosomas sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono y se dejaron secar las rejillas antes del examen. Se usó la misma cantidad relativa de magnetosomas para preparar todas las muestras, por tanto la agregación en una muestra particular no era el resultado de una diferencia en la concentración de magnetosomas.

Se llevaron a cabo medidas magnéticas usando un magnetómetro de muestras vibratorio (VSM, Quantum Design, San Diego, CA). Para las medidas magnéticas, se depositaron 25  $\mu\text{l}$  de una suspensión líquida de células

bacterianas magnetotácticas, cadenas de magnetosomas o magnetosomas individuales que contenían  $2 \cdot 10^{-3}$  % en peso de magnetosomas sobre un sustrato de sílice. Se colocaron entonces las muestras dentro de una cápsula hecha de gelatina dura en dirección paralela a la del campo magnético. Se efectuaron tres tipos de medidas magnéticas, aquellas de magnetización remanente de saturación isotérmica (SIRM en inglés) y los bucles de histéresis mayor o menor. Se usaron las medidas de SIRM para determinar la composición de los magnetosomas siguiendo un método similar al descrito anteriormente (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309) y mostraron que la magnetita en los magnetosomas se había oxidado casi completamente a maghemita. Este resultado no era inesperado, ya que las suspensiones de material magnético no estaban recién preparadas y era conocido que la magnetita de los magnetosomas se oxida con el tiempo (Chen *et al.*, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2005, 240, 790-802). Maghemita y magnetita tienen propiedades magnéticas muy similares a temperatura ambiente (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309). El hecho de que la magnetita de los magnetosomas se haya transformado en maghemita no cambia sustancialmente las conclusiones extraídas de este modelo, puesto que maghemita y magnetita tienen propiedades magnéticas muy similares a temperatura ambiente (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309). Se llevaron a cabo medidas de bucle de histéresis mayor a 300 K para determinar la cantidad de maghemita contenida en las muestras. Esta última se determina dividiendo la magnetización de saturación de las muestras entre la magnetización de saturación de la maghemita. Para nanopartículas tan grandes como los cristales de magnetosomas, la magnetización de saturación es la del material bruto (en este caso maghemita bruta). Finalmente, se llevaron a cabo las medidas de los bucles de histéresis menor también registrando la magnetización de las muestras en función de un campo magnético continuo que se aplica entre  $-H_0$  y  $H_0$ , en que  $H_0$  es 23 mT, 36 mT, 66 mT u 88 mT.

Se llevaron a cabo estos experimentos con las bacterias enteras, cadenas de magnetosomas y magnetosomas individuales suspendidos en agua desionizada ultrapura (18,6 MΩ) o en gel de agarosa acuoso (al 2 % en peso). La concentración de maghemita era de  $457 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  para la suspensión líquida que contiene las células enteras,  $435 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  para aquella que contiene las cadenas de magnetosomas y  $380 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  para aquella que contiene los magnetosomas individuales. Se vertieron 250  $\mu\text{l}$  de cada una de estas suspensiones dentro de tubos de polipropileno y se colocaron en el centro de una bobina productora de un campo magnético oscilante de frecuencia 108 kHz, fijándose la amplitud de campo a 23 mT, 36 mT, 66 mT u 88 mT. Para generar la corriente alterna, se conectó la bobina a un generador (inductor Celes C97104) y se midió la temperatura usando una sonda de fibra óptica (Luxtron STF-2, BFi OPTILAS SAS).

#### Resultados y discusiones:

La Figura 1(a) representa una micrografía electrónica de transmisión (MET) de células de *Magnetospirillum magneticum* cepa AMB-1 que muestra cadenas típicas de magnetosomas. El volumen ocupado por los magnetosomas en una célula entera es bastante pequeño, típicamente de  $\sim 0,02$  %. Se sometió una suspensión acuosa que contiene células enteras intactas de *M. magneticum* a un campo magnético oscilante de frecuencia  $\nu = 108$  kHz y amplitudes de campo  $H_0 = 23$  mT y  $H_0 = 88$  mT. Las tasas de calentamiento de las células suspendidas en líquido aumentaron cuando aumentó la fuerza del campo magnético de 23 mT a 88 mT (Figuras 2(a) and 2(b)). A partir de las pendientes de las variaciones con el tiempo de la temperatura medida a  $22^\circ\text{C}$  ( $\Delta T / \delta T$ ), se estimó la TAE de las células intactas suspendidas en líquido usando la ecuación 1 siguiente (Mornet *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 2161-2175; Hergt *et al.*, *J. Magn. Magn. Matter.*, 2005, 293, 80-86):

$$TAE = C_{\text{agua}} \left( \frac{\Delta T}{\delta T} \right) \frac{1}{X_m} \quad (1)$$

en que  $C_{\text{agua}}$  es la capacidad térmica específica del agua ( $C_{\text{agua}} = 4,184 \text{ J/g} \cdot \text{K}$ ) y  $X_m$  es la concentración de hierro en g por ml de disolvente (agua). Usando la fórmula anterior, se dedujo que la TAE de la suspensión bacteriana entera aumentaba de  $108 \pm 32 \text{ W/g}_{\text{Fe}}$  a  $864 \pm 130 \text{ W/g}_{\text{Fe}}$  cuando aumentaba la amplitud del campo magnético de 23 mT a 88 mT. Para determinar si la cantidad de calor (IAE) generada por las bacterias magnetotácticas enteras surge de la rotación de bacterias enteras, de pérdidas por histéresis o de ambos mecanismos, se midieron las áreas de los bucles de histéresis menor de las células enteras intactas (Figura 2(c)), que proporcionan estimaciones de las pérdidas por histéresis de las células enteras. Usando el método de Hergt *et al.* (Hergt *et al.*, *J. Magn. Magn. Matter.*, 2005, 293, 80-86), se dedujo a partir de las áreas de los bucles de histéresis menor mostrados en la Figura 2(c) que las pérdidas por histéresis de las células intactas aumentaban de  $54 \pm 25 \text{ W/g}_{\text{Fe}}$  a 23 mT a  $810 \pm 121 \text{ W/g}_{\text{Fe}}$  a 88 mT. Estos valores de TAE son similares a aquellos medidos para las células bacterianas en suspensión (Figura 2(d)). Inesperadamente, la TAE determinada para células fijadas en gel de agarosa era significativamente menor que las áreas de los bucles de histéresis menor y no parecía proporcionar buenas estimaciones de las pérdidas por histéresis (Figura 2(d)). Esto podría ser debido a la pérdida de algunas de las células bacterianas durante la preparación del gel, suministrando una concentración de magnetosomas menor que en las demás muestras. A partir de estos resultados, se concluyó que la rotación de células bacterianas intactas no contribuye a la producción de calor en este caso. Debido a su gran peso y volumen, las células intactas de *M. magneticum* no son capaces de rotar suficientemente bien bajo la aplicación de un campo magnético externo para generar calor. La ausencia de contribución de la rotación puede confirmarse estimando la TAE debido a la rotación de las células bacterianas  $TAE_{\text{rot}}$ . Esta última se estima usando la ecuación 2 siguiente (Hergt *et al.*, *IEEE Trans. Mag.*, 1998, 34, 3745-3754).

$$TAE_{rot} = \frac{1}{2} \frac{(M_s H_0)^2}{K_b T} \frac{1}{\rho V \tau_b} \frac{1}{1 + (\omega \tau_b)^2} \quad (2)$$

En (2), se supone que el tiempo de relajación browniana,  $\tau_b$ , es mucho menor que el tiempo de relajación de Néel  $\tau_n$ , en que  $\tau_b = 3\eta V_h / K_b T$  y  $\tau_n = \tau_0 \exp(E_a / K_b T)$ . Para las diferentes muestras,  $\tau_b$  se encuentra entre  $2,5 \cdot 10^{-5}$  s y  $0,3$  s (Mornet *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 2004, 14, 2161-2175. Dado que  $\tau_0 \sim 10^{-9}$  s y que la relación entre la energía anisotrópica de una cadena de magnetosomas y la energía térmica,  $E_a / K_b T \sim 480$  (Alphandéry *et al.*, *ACS Nano* 2009, 3, 1539-1547), se encuentra que  $\tau_n \sim 3 \cdot 10^{38}$  s y por ello  $\tau_b / \tau_n \ll 1$ . Esto justifica el uso de (2) para medir la TAE. En la ecuación 2,  $\omega = 2\pi f$ , en que  $f = 108$  kHz es la frecuencia del campo magnético oscilante,  $M_s$  es la magnetización de saturación de la maghemita ( $M_s = 0,390$  A/m),  $H_0$  es la amplitud del campo magnético aplicado ( $23$  mT  $< H_0 < 88$  mT),  $V = 20 \cdot 10^{-17}$  cm<sup>3</sup> es el volumen de una cadena típica de magnetosomas (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309),  $\rho \sim 5$  g/cm<sup>3</sup> es el peso específico de la maghemita,  $K_b \sim 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K es la constante de Boltzmann y  $\tau_b \sim 10$  s es el tiempo de relajación browniana de una célula bacteriana intacta en agua. Los tiempos de relajación browniana se estiman usando la fórmula  $\tau_b = 3\eta V_h / K_b T$ , en que  $V_h$  es el volumen hidrodinámico. Para las bacterias magnetotáticas enteras, se considera que  $V_h = 4/3\pi r^3$ , en que  $r$  es la mitad de la longitud típica de una bacteria ( $1,5$   $\mu$ m). Usando estos valores, se encuentra que la  $TAE_{rot}$  se encuentra entre  $5 \cdot 10^{-2}$  W/g<sub>Fe</sub> y  $7 \cdot 10^{-1}$  W/g<sub>Fe</sub> para valores de  $H_0$  entre 23 y 88 mT. Estos valores son mucho menores que la TAE medida debida a pérdidas por histéresis, que son  $\sim 82 \pm 58$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT y  $841 \pm 153$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT (Fig. 2(d)), en que estos valores son medias entre la TAE deducida a partir de la tasa de calentamiento en disolución y aquellas deducidas a partir de las medidas de los bucles de histéresis menor. Por tanto, la rotación de las células bacterianas enteras no parece contribuir al aumento de temperatura observado. Como se indica en la Figura 2(d), la TAE parece ser completamente debida a pérdidas por histéresis. Estas pérdidas se vuelven mucho más significativas a amplitudes de campo magnético mayores ( $TAE \sim 841 \pm 153$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT) que a 23 mT ( $IAE \sim 82 \pm 58$  W/g<sub>Fe</sub>). Este hallazgo, pérdidas por histéresis aumentadas al aumentar la amplitud de campo magnético, se ha observado anteriormente para nanopartículas de magnetita sintetizadas químicamente (Hergt *et al.*, *IEEE Trans. Mag.*, 1998, 34, 3745-3754). LA TAE por ciclo de células enteras en suspensión, que se define como la TAE dividida entre la frecuencia del campo magnético oscilante, se encuentra entre  $0,7 \pm 0,5$  J/kg<sub>Fe</sub> y  $7,8 \pm 1,4$  J/kg<sub>Fe</sub>. Estos valores son mayores que la mayoría de los obtenidos con nanopartículas magnéticas sintetizadas químicamente, que se encuentran típicamente entre  $0,001$  J/kg<sub>Fe</sub> y  $1,2$  J/kg<sub>Fe</sub> para un amplio intervalo de tamaños de nanopartícula magnética y composiciones, así como para una gran selección de frecuencias y amplitudes de campo magnético (Dutz *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, 308, 305-312; Ma *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2004, 268, 33-39; Jordan *et al.*, *J. Nano. Res.*, 2003, 5, 597-600; Brusentsov *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2001, 225, 113-117; Chan *et al.*, "Scientific and clinical applications of magnetic carriers", Häfeli *et al.* (eds.), Plenum Pres, NY, 1997, 607-618). Se concluye que las suspensiones de bacterias magnetotáticas enteras producen una mayor cantidad de calor que la mayoría de nanopartículas magnéticas sintetizadas químicamente en estas condiciones experimentales.

Se extrajeron cadenas de magnetosomas de células bacterianas presuntamente para potenciar su rotación en el campo magnético sin la estructura celular que interfiere con la rotación. Para verificar que los magnetosomas se extraían realmente de las bacterias y que permanecen como cadenas, se usó microscopía electrónica. La Figura 1(b) muestra agrupaciones típicas de cadenas de magnetosomas (Alphandéry *et al.*, *ACS Nano*, 2009, 3, 25 1539-1547; Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309), que no agregan en grumos pero están suficientemente cercanas entre sí como cadenas para interactuar magnéticamente. Se muestran las tasas de producción de calor de las cadenas de magnetosomas en las Figuras 3(a) y 3(b) para amplitudes de campo magnético de 23 y 88 mT, respectivamente. En disolución, se caracterizan por un aumento de  $\sim 43^\circ\text{C}$  durante un periodo de tiempo de 1500 s a 23 mT (Fig. 3(a)) y por un aumento de  $\sim 48^\circ\text{C}$  durante el mismo periodo de tiempo a 88 mT (Fig. 3(b)). Estas tasas de calentamiento son entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 veces mayores que las obtenidas con las células enteras (Fig. 2(a), 2(b), 4(a) y 4(b)). Esto sugiere que las cadenas de magnetosomas producen pérdidas por histéresis mayores que las células bacterianas intactas o que su rotación en el campo magnético oscilante contribuye a la producción de calor o ambas cosas. Para distinguir cuál, si alguna, de estas explicaciones es la responsable de las mayores tasas de producción de calor, se determinaron las pérdidas por histéresis de las cadenas de magnetosomas. La Figura 3(c) muestra los bucles de histéresis menor de las cadenas a 23 y 88 mT. Las áreas de los bucles de histéresis menor para las cadenas de magnetosomas eran menores que las obtenidas con las células bacterianas intactas (Figura 2(c)). Esta reducción es probablemente debida a interacciones magnéticas entre las cadenas de magnetosomas (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309) y por tanto se concluye que el mayor tasa de producción de calor observada para las cadenas de magnetosomas en comparación con las células bacterianas intactas suspendidas en líquido no es debida a un aumento de las pérdidas por histéresis, sino a la rotación de las cadenas. La contribución de la rotación a la producción de calor por las cadenas de magnetosomas puede confirmarse adicionalmente estimando la TAE de las cadenas de magnetosomas suspendidas en líquido. Usando la ecuación (1) y los valores de  $\Delta T / \delta T$  para las cadenas de magnetosomas en suspensión (Fig. 3(a) y 3(b)), se encuentra que la TAE aumenta de  $\sim 864 \pm 86$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT a  $\sim 1242 \pm 124$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT (Fig. 3(d)). Estos valores de TAE son mayores que las pérdidas por histéresis deducidas a partir de la TAE de las cadenas de magnetosomas en el gel ( $TAE \sim 54 \pm 22$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT y  $TAE \sim 487 \pm 97$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT) o a partir de las áreas de bucles de histéresis menor ( $TAE \sim 108 \pm 41$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT y  $TAE \sim 486 \pm 97$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT). Para confirmar la contribución de la rotación al mecanismo productor de calor de las cadenas de magnetosomas, se determinó la  $TAE_{rot}$  usando la ecuación 2, que incluye el tiempo de relajación browniana. Esta fórmula es solo aplicable por debajo de la región de saturación donde la TAE muestra una fuerte dependencia de la

amplitud de campo (Hergt *et al.*, *IEEE Trans. Mag.*, 1998, 34, 3745-3754). Puesto que la saturación ocurre por encima de  $\sim 36$  mT (Figura 3(d)), se midió solo la TAE a 23 mT. Usando un tiempo de relajación browniana  $\tau_b \sim 1,2 \cdot 10^{-4}$  s, se encuentra que la  $TAE_{rot} \sim 3600$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT, que es mayor que la TAE de  $774 \pm 145$  W/g<sub>Fe</sub> que se midió experimentalmente midiendo la diferencia entre la TAE de las cadenas de magnetosomas suspendidas en líquido ( $864 \pm 86$  W/g<sub>Fe</sub>) y la TAE debida a las pérdidas por histéresis ( $90 \pm 59$  W/g<sub>Fe</sub>). La diferencia entre la predicción teórica y la observación experimental puede explicarse por la agregación parcial de las cadenas de magnetosomas. Se concluye que la rotación contribuye al mecanismo de calentamiento de las cadenas de magnetosomas y que esta contribución se reduce desde  $90 \pm 10$  % de la TAE de 23 mT hasta  $40 \pm 10$  % de la misma TAE a 88 mT (Figura 3(c)). Esta reducción podría explicarse por la mayor potenciación de las pérdidas por histéresis al aumentar la amplitud de campo magnético que la TAE debida a la rotación de las cadenas de magnetosomas en el campo magnético (Hergt *et al.*, *IEEE Trans. Mag.*, 1998, 34, 3745-3754).

La última muestra que se ensayó fue una suspensión de magnetosomas individuales cuyas membranas se habían retirado en su mayor parte usando una combinación de calor y un detergente que disolvía lípidos, el dodecilsulfato de sodio (SDS). Estos cristales no permanecen en cadenas como se muestra en la Figura 1(c). Estos nanocristales interaccionan y se organizan en agrupaciones compactas de nanocristales individuales (Alphancery *et al.*, *ACS Nano.*, 2009, 3, 1539-1547, Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem.*, 2008, 112, 12304-12309; Kobayashi *et al.*, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2006, 245, 538-555) al contrario que los magnetosomas con membranas mostrados en la Figura 1(b). Se muestran las tasas de calentamiento de la suspensión líquida que contiene estos magnetosomas individuales en las Figuras 4(a) y 4(b) para amplitudes de campo magnético de 23 mT y 88 mT. Son menores que las observadas para las cadenas de magnetosomas suspendidas en líquido tanto a 23 mT como a 88 mT (Figuras 3(a), 3(b), 4(a) y 4(b)). La diferencia en las tasas de calentamiento en disolución observada entre las cadenas de magnetosomas y los magnetosomas individuales puede ser debida a una diferencia en la contribución de la rotación de magnetosoma o de las pérdidas por histéresis a la TAE o una combinación de ambos. Se estimaron las pérdidas por histéresis a partir de las áreas del bucle de histéresis menor (Figura 4(c)), suministrando valores de TAE que se encuentran entre  $270 \pm 100$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT y  $427 \pm 85$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT o a partir de las tasas de calentamiento de los magnetosomas individuales en el gel (Figuras 4(a) y 4(b)), suministrando valores de TAE que se encuentran entre  $135 \pm 70$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT y  $432 \pm 86$  W/g<sub>Fe</sub> a 88 mT. Las pérdidas por histéresis estimadas mediante cualquiera de los dos métodos mencionados anteriormente (Figura 4(d)) son similares a aquellas estimadas para las cadenas de magnetosomas (Figura 3(d)). Por lo tanto, la diferencia en la TAE observada entre las cadenas de magnetosomas y los magnetosomas individuales suspendidos en líquido debe ser el resultado de una diferencia en la capacidad de las estructuras de rotar en el campo magnético. La ecuación 2 predice que la TAE debida a la rotación de los magnetosomas individuales suspendidos en líquido debería ser la misma que la deducida para las cadenas de magnetosomas,  $TAE_{rot} \sim 3600$  W/g<sub>Fe</sub> a 23 mT. Por lo tanto, la menor tasa de calentamiento observada para los magnetosomas individuales es debida lo más probablemente al hecho de que estos últimos tienden más a la agregación en grumos que las cadenas de magnetosomas. La agregación de los magnetosomas individuales es claramente evidente usando microscopia electrónica (Figura 1(c)) y puede observarse también visualmente en suspensión líquida. Previene que estos magnetosomas roten tan fácilmente como las cadenas de magnetosomas.

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- (i) La TAE de cada una de las tres muestras magnéticas (bacterias magnetotácticas enteras, cadenas de magnetosomas y magnetosomas individuales) es mayor que la reseñada para nanopartículas superparamagnéticas menores.
- (ii) La contribución predominante a la producción de calor por las células bacterianas intactas parece ser las pérdidas por histéresis, mientras que la rotación física y pérdidas por histéresis son ambas responsables de la generación de calor por las cadenas de magnetosomas y los magnetosomas individuales mezclados en disolución.
- (iii) En contraposición con su comportamiento en disolución, las cadenas de magnetosomas y magnetosomas individuales deberían ser menos capaces de rotar *in vivo*. Por lo tanto, la cantidad de calor que deberían generar *in vivo* podría predecirse midiendo sus pérdidas por histéresis. Puesto que las cadenas de magnetosomas y magnetosomas individuales tienen pérdidas por histéresis similares, presuntamente son ambos candidatos equivalentemente buenos para la terapia térmica *in vivo*.

Ejemplo 3:

*Eficacia de calentamiento mejorada de cadenas de magnetosomas extraídas obtenidas sintetizando bacterias magnetotácticas en presencia de diversos agentes quelantes y/o metales de transición*

En este ejemplo, se describen diversos métodos para mejorar la eficacia de calentamiento de las cadenas de magnetosomas extraídas suspendidas en agua. Estos métodos usan diversos aditivos introducidos en el medio de crecimiento de bacterias magnetotácticas AMB-1. Estos aditivos son agentes quelantes tales como moléculas de bisfosfonato, dopamina, rodamina, EDTA o metales de transición tales como cobalto.

Materiales y métodos:

Se preparó en primer lugar el medio de crecimiento de las bacterias magnetotácticas siguiendo el mismo método

que se describe en el ejemplo 1. Se añadió entonces uno de los siguientes aditivos al medio de crecimiento de las bacterias magnetotáticas: diferentes tipos de ácidos bisfosfónicos (alendronato, risedronato o neridronato) 0,4  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  o 40  $\mu\text{M}$ , una disolución de rodamina 4  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  o 400  $\mu\text{M}$ , una disolución de EDTA 0,4  $\mu\text{M}$  o 4  $\mu\text{M}$ , una disolución de dopamina 0,4  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$  o 40  $\mu\text{M}$ , una disolución de quinato de cobalto 2  $\mu\text{M}$  o 20  $\mu\text{M}$ . Se insertó 1 ml de una suspensión de bacterias magnetotáticas en 1 litro de los medios de crecimiento anteriores y las bacterias crecieron durante 10 días. Después de 10 días de crecimiento, se recogieron las bacterias y se extrajeron las cadenas de magnetosomas bacterianos de las bacterias siguiendo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo 1. Se depositaron entonces 5  $\mu\text{l}$  de una suspensión de cadenas de magnetosomas bacterianos que contenían  $2 \times 10^{-4}$  % en peso de magnetosomas sobre una rejilla de carbono para análisis de microscopia electrónica de transmisión (MET). Se usó la MET para determinar los tamaños de los magnetosomas y para estimar las longitudes de las cadenas. Para evaluar las propiedades de calentamiento de los diversos tipos de cadenas de magnetosomas extraídas, se mezclaron estas últimas con agua. Se estimaron las concentraciones de las diferentes suspensiones como la cantidad de maghemita por mililitro. Eran de 0,3 mg/ml para la suspensión que contenía los magnetosomas sintetizados en presencia de varios ácidos bisfosfónicos, 1,52 mg/ml para las suspensiones que contenían magnetosomas dopados con Co y 0,406 mg/ml para las que contenían los magnetosomas sintetizados en presencia de EDTA, rodamina, dopamina o alendronato. Se calentaron las suspensiones con la aplicación de un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerzas de 43 o 80 mT. Se midió la variación de temperatura de estas suspensiones usando una microsonda de termopar (IT-18, Physitemp, Clifton, EE.UU.).

#### Resultados y discusión:

En esta sección, se comparan las propiedades de las cadenas de magnetosomas que se han obtenido cultivando las bacterias magnetotáticas en condiciones estándares, concretamente en ausencia de agentes quelantes y/o metales de transición (CM de control), con aquellas de los magnetosomas que se han obtenido cultivando las bacterias magnetotáticas en presencia de EDTA 0,4  $\mu\text{M}$  (CM-EDTA). Se presentan los resultados de CM-EDTA puesto que dan como resultado el cambio más importante de las propiedades de magnetosomas, concretamente el mayor aumento de los tamaños de magnetosoma, longitudes de cadena de magnetosoma y eficacia de calentamiento en comparación con la CM de control.

Como se muestra en los histogramas de las Figuras 5(a) y 5(d), tanto para las CM de control como las CM-EDTA, las distribuciones de tamaño de magnetosoma parecen ser bimodales con un mayor porcentaje de magnetosomas grandes que pequeños. El porcentaje de magnetosomas grandes es mayor para las CM-EDTA (Figura 5(d)) que para las CM de control (Figura 5(a)). Además, los ajustes las distribuciones de tamaño de magnetosoma indican que el tamaño de los magnetosomas grandes aumenta de ~42 nm para las CM de control (Figura 5(a)) hasta ~60 nm para las CM-EDTA (Figura 5(d)). Se observa también que el porcentaje de magnetosomas pequeños (< 30 nm) es significativo para las CM de control (> 25 %, Figura 5(a)), mientras que es pequeño para las CM-EDTA (<10 %, Figura 5(d)). Como puede observarse comparando los histogramas presentados en las Figuras 5(b) y 5(e), la longitud media de cadena de magnetosomas aumenta también de ~150 nm para las CM de control (Figura 5(b)) hasta ~300 nm para las CM-EDTA (Figura 5(e)). Las cadenas largas de magnetosomas (> 800 nm de longitud) están solo presentes para las CM-EDTA (Figura 5(e)). Cuando se aplica el campo magnético alterno a las suspensiones que contienen las CM-EDTA, produce un aumento de la temperatura que es mayor para las CM-EDTA que para las CM de control para ambas fuerzas de campo magnético de 43 mT y 80 mT (Figuras 5(c) y 5(f)). Además, las temperaturas de saturación para las CM-EDTA (35°C a 43 mT y 45°C a 80 mT, Figura 5(f)) son ambas mayores que las obtenidas para las CM de control (28°C a 43 mT y 35°C a 80 mT, Figura 5(c)). Estos rasgos revelan la mayor capacidad de calentamiento de las CM-EDTA en comparación con las CM de control, lo que podría atribuirse a un aumento de los tamaños de magnetosoma y/o longitudes de cadena de magnetosomas.

Para una serie de otros agentes quelantes introducidos en el medio de crecimiento bacteriano, pueden observarse las mismas tendencias que las observadas con EDTA 0,4  $\mu\text{M}$ , pero con un efecto menos pronunciado. Como se muestra en la Figura 6(a), la temperatura aumenta más rápidamente bajo la aplicación de un campo magnético alterno de fuerza 43 o 80 mT para las cadenas de magnetosomas procedentes de bacterias cultivadas en presencia de diversos agentes quelantes (rodamina B 4  $\mu\text{M}$ , dopamina 4  $\mu\text{M}$ , alendronato 4  $\mu\text{M}$ ) que para las CM de control.

Cuando se sintetizaron los magnetosomas en presencia de risedronato 4  $\mu\text{M}$  o alendronato 4  $\mu\text{M}$ , el porcentaje de magnetosomas de tamaños mayores de 45 nm se volvía mayor que el de magnetosomas sintetizados en ausencia de ácido bisfosfónico (Figuras 17(a), 17(b) y 17(c)). El porcentaje de cadenas con longitudes mayores de 400 nm es también mayor para los magnetosomas sintetizados en presencia de ácido bisfosfónico (Figuras 17(e) y 17(f)) que para aquellos sintetizados en ausencia de ácido bisfosfónico (Figura 17(d)). Debido a estos comportamientos, la variación de temperatura inducida por la aplicación de un campo magnético es mayor para el magnetosoma sintetizado en presencia de risedronato 4  $\mu\text{M}$  (Figura 17(h)) o alendronato 4  $\mu\text{M}$  (Figura 17(i)) que para aquellos sintetizados en ausencia de ácido bisfosfónico (Figura 17(g)). Este comportamiento se observa tanto para una fuerza de campo magnético de 40 mT como de 80 mT. Para ácidos bisfosfónicos con concentraciones 0,4  $\mu\text{M}$  introducidos en el medio de crecimiento, se observaron resultados similares a aquellos obtenidos para una concentración 4  $\mu\text{M}$ . En contraposición, para una concentración de ácido bisfosfónico 40  $\mu\text{M}$  introducido en el medio de crecimiento bacteriano, las propiedades de las cadenas de magnetosomas bacterianos no eran significativamente diferentes de las de los magnetosomas bacterianos sintetizados en condiciones estándares. Estos resultados sugieren que las concentraciones de ácido bisfosfónico necesarias para alcanzar una eficacia de calentamiento óptimo se encuentran

entre 0,1 y 40  $\mu\text{M}$ , en particular entre 0,1 y 10  $\mu\text{M}$ , típicamente entre 0,4 y 4  $\mu\text{M}$ . Se ensayó también un tercer ácido bisfosfónico (ácido neridróico) y suministró resultados similares a los obtenidos con ácido alendrónico o ácido risedróico.

Se cultivaron también las bacterias magnetotácticas AMB-1 en un medio de crecimiento que contenía los compuestos químicos del medio ATCC 1653 y una disolución 20  $\mu\text{M}$  o 400  $\mu\text{M}$  de rodamina. Cuando se sometían 55  $\mu\text{g}$  de cadenas de magnetosomas sintetizados en presencia de rodamina y mezclados con 1 ml de agua a un campo magnético alterno de 43 mT, la temperatura de la suspensión aumentaba en 3°C en 30 minutos. Para las cadenas de magnetosomas sintetizadas en ausencia de rodamina, se observó un aumento de temperatura de solo 1°C en las mismas condiciones experimentales. Esto muestra que la presencia de rodamina en el medio de crecimiento suministra una capacidad de calentamiento mejorada de las cadenas de magnetosomas.

Se ha ensayado también la eficacia de calentamiento de las cadenas de magnetosomas extraídas sintetizadas introduciendo una disolución de quinato de cobalto 20  $\mu\text{M}$  en el medio de crecimiento bacteriano. Se ha detectado la presencia de cobalto en algunos de los magnetosomas usando medidas de espectroscopia electrónica de pérdida de energía (EELS en inglés). Este resultado está de acuerdo con el de Staniland *et al.* (S. Staniland *et al.*, *Nature Nanotech.*, 2008, 3, 158-162), que mostraba también la presencia de cobalto en los magnetosomas para bacterias magnetotácticas sintetizadas en condiciones similares. Como se muestra en la Figura 6(b), cuando la suspensión que contiene los magnetosomas dopados con Co ( $C_{\text{Fe203}} = 1,52 \text{ mg/ml}$ ) se expone a un campo magnético alterno de fuerza 80 mT y frecuencia 183 kHz, la temperatura de la suspensión aumenta más que la que contiene las CM de control. Puesto que se ha mostrado que los tamaños de magnetosomas y longitudes de cadena de magnetosomas son muy similares para los magnetosomas no dopados y dopados con Co, la eficacia de calentamiento potenciada de los magnetosomas dopados con Co podría explicarse por un aumento de su anisotropía magnetocristalina.

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- (i) La introducción de agentes quelantes de hierro de concentraciones que se encuentran entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 1 mM en el medio de crecimiento bacteriano de AMB-1 suministra propiedades de calentamiento mejoradas de las cadenas de magnetosomas extraídas mezcladas en disolución. Se cree que este comportamiento es debido a un aumento de los tamaños de magnetosoma y/o longitudes de cadena de magnetosomas cuando las bacterias se cultivan en estas condiciones.
- (ii) La introducción de quinato de cobalto a una concentración que se encuentra entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 1 mM en el medio de crecimiento bacteriano de AMB-1 suministra también propiedades de calentamiento mejoradas de las cadenas de magnetosomas extraídas mezcladas en disolución. Se cree que este comportamiento es debido a un aumento de la anisotropía magnetocristalina de los magnetosomas dopados con cobalto.
- (iii) La introducción de agentes quelantes de hierro y/o quinato de cobalto en el medio de crecimiento bacteriano proporciona un modo para potenciar la eficacia de calentamiento de las cadenas de magnetosomas. Esto abre el camino para el uso de estas cadenas de magnetosomas en menor cantidad en termoterapia, reduciendo por ello el riesgo de toxicidad inducido por la presencia de cadenas de magnetosomas.

Ejemplo 4:

*Eficacia de la termoterapia evaluada in vitro.*

Materiales y métodos:

Se obtuvieron células MDA-MB-231 de las American Type Culture Collections (ATCC). Se cultivaron las estirpes celulares en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado que contenía 10 % de suero fetal bovino (FCS en inglés), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, estreptomycin 50 U/ml (todos adquiridos en Life Technologies Inc.). Se llevaron a cabo todos los experimentos *in vitro* a 37°C en una incubadora con 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Se evaluó la viabilidad celular usando el denominado MTT (ensayo de microcultivo de tetrazolio, T. Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63). Esta técnica mide la capacidad de las enzimas mitocondriales de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (adquirido en Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) a cristales de formazano púrpuras. Se sembraron las células a una densidad de  $2 \cdot 10^4$  células por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon, Estrasburgo, Francia) y se incubaron en el medio de cultivo durante 24 horas. Se retiró entonces el medio y se reemplazó por medio FCS al 10 % que contenía diversas nanopartículas (cadenas de magnetosomas, magnetosomas individuales, SPION@citrat y SPION@PEG) con diferentes concentraciones de maghemita ( $0,125 \text{ mg/ml} < C_{\text{Fe203}} < 1 \text{ mg/ml}$ ). Se expusieron estas suspensiones (o no para el control) a un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerza 43 mT. Se llevó a cabo el tratamiento durante 20 minutos una o dos veces. Después de 72 horas de incubación, se lavaron las células con una disolución salina de tampón fosfato (PBS de Life Technologies) y se incubaron con 0,1 ml de MTT (2 mg/ml) durante 4 horas adicionales a 37°C. Se disolvió entonces el producto insoluble (compuesto esencialmente por formazano) añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de DMSO (Sigma-Aldrich). Se midió la absorbancia del formazano solubilizado a 570 nm usando un lector de microplacas Labsystem Multiscan MS. Proporcionaba una estimación del número de mitocondrias funcionales, un número que es proporcional al número de células vivas. Se estimó entonces el porcentaje de inhibición como el número de células

mueras (concretamente células en apoptosis) dividido entre el número total de células.

Para los estudios de toxicidad, se sembraron las células en placas Petri (diámetro de 30 nm con 50.000 células por placa Petri) y se hicieron crecer durante 24 horas. Después de este periodo inicial de crecimiento, se incubaron las células en presencia (o no para el control) de los diversos tipos de nanopartículas estudiados durante 24 horas, 48 horas o 72 horas. Al final del tiempo de incubación, se expusieron las células (o no para el control) a un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerzas 20 mT, 43 mT o 60 mT. Se llevó a cabo el tratamiento durante 20 minutos una o dos veces. Después del tratamiento, se lavaron las células dos veces con PBS. Se añadieron entonces para recoger las células 250 µl de tripsina-EDTA a las células adherentes. Se añadieron 750 µl del medio líquido a las células recogidas para homogeneizar la suspensión. Se centrifugó entonces la suspensión a 700 G durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS. Para evaluar el porcentaje de células vivas, se añadieron 5 µl de yoduro de propidio (PI) (1 mg/ml mezclado con etanol, Sigma Aldrich) a las suspensiones celulares. Puesto que el PI penetra solo en células muertas, la medida de su fluorescencia proporciona una estimación del porcentaje de células muertas. A partir de esta estimación, podría deducirse el porcentaje de células vivas. Para medir la fluorescencia de PI, se analizaron las células en un citómetro de flujo (Beckton Dickinson FACSCalibur 3C), que contiene un láser de argón con emisión a 488 nm y un detector FL3-H capaz de detectar la fluorescencia de PI excitado por el láser. Se midieron 10.000 células por muestra para determinar el porcentaje de células vivas.

Para medir las propiedades de calentamiento de las suspensiones celulares *in vitro*, se llevó a cabo para las células en suspensión el mismo experimento descrito anteriormente para las células adherentes. La única diferencia en este caso es que las células se han mezclado inmediatamente con las cadenas de magnetosomas y tratado por aplicación del campo magnético. Se midió la temperatura con la microsonda de termopar (IT-18, Physitemp, Clifton, EE.UU.), que mide la temperatura macroscópicamente (concretamente, la temperatura de la suspensión celular en conjunto, pero no la temperatura en cada célula individual).

Para estimar el número de células magnéticas, se siguió esencialmente el mismo protocolo que se describe anteriormente para las células en suspensión. Se incubaron 50.000 células contenidas en el medio líquido descrito anteriormente en presencia de diversas nanopartículas durante 5 a 20 minutos. Durante la incubación, se aplicó un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo de 43 mT. Después del tratamiento, se recogieron las células magnéticas colocando un imán fuerte de 0,6 mT cerca de las células en suspensión. Se retiró el sobrenadante que contiene las células no magnéticas, mientras que las células que se habían atraído por el imán se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se estimó entonces el porcentaje de células magnéticas usando el citómetro de flujo.

#### Resultados y discusiones:

Para el tratamiento con las células en suspensión, se incubaron en primer lugar las células durante unos pocos minutos en presencia de una suspensión de cadenas de magnetosomas de diversas concentraciones. Al mismo tiempo, se aplicó un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y diversas fuerzas ( $0 \text{ mT} < B < 60 \text{ mT}$ ). Se midió entonces el porcentaje de células vivas en el citómetro de flujo para las diferentes fuerzas de campo magnético. La Figura 7(a) muestra que el porcentaje de células vivas es alto ( $> 80 \%$ ) para las diferentes fuerzas del campo magnético aplicado, indicando baja toxicidad. Esto podría explicarse por el hecho de que las células no alcanzan el estado de apoptosis justo después del tratamiento. Para las células incubadas en presencia de diversas cantidades de cadenas de magnetosomas durante pocos minutos, se muestran las variaciones de temperatura de la suspensiones, que son debidas a la aplicación del campo magnético alterno, en las Figuras 7(b), 7(c) y 7(d) para fuerzas de campo magnético de 20 mT (Figura 7(b)), 43 mT (Figura 7(c)) y 60 mT (Figura 7(d)) respectivamente. Como se muestra en la Figura 7(b), la fuerza de campo magnético de 20 mT es demasiado débil para dar como resultado un aumento de temperatura. En contraposición, la Figura 7(d) muestra que la fuerza de campo magnético de 60 mT induce un gran aumento de temperatura. Este último tiene lugar incluso para células incubadas en ausencia de cadenas de magnetosomas, indicando que surge de las corrientes de Foucault. El campo magnético de fuerza 43 mT es aquel que proporciona un comportamiento aceptable, concretamente, sin variación de temperatura en ausencia de las cadenas de magnetosomas y un aumento de temperatura que aumenta al aumentar la cantidad de cadenas de magnetosomas incubadas (Figura 7(c)).

Para las células adherentes incubadas durante más de unos pocos minutos, se midió también el porcentaje de células MDA-MB-231 vivas en función de las fuerzas de campo magnético (Figura 8). Se incubaron las células en presencia de suspensiones de cadenas de magnetosomas de diversas concentraciones durante 24 horas (D1, Figura 8(a)), 48 horas (D2, Figura 8(b)) o 72 horas (D3, Figuras 8(c) y 8(d)). Se llevó a cabo el tratamiento inducido por calor una vez (Figuras 8(a) a 8(c)) o dos veces (Figura 8(d)). En ausencia de campo magnético, la presencia de cadenas de magnetosomas es tóxica (menos de un 50 % de células vivas) para 1 mg de cadenas de magnetosomas incubadas durante 48 horas o 72 horas. Para todas las demás condiciones ensayadas, la presencia de las cadenas de magnetosomas exhibe una baja toxicidad (más de un 50 % de células vivas). En presencia de un campo magnético, las Figuras 8(a) a 8(c) muestran que el porcentaje de células vivas se reduce significativamente para un campo magnético de 43 mT o más y para una cantidad de magnetosomas incubados de más de 0,5 mg. La Figura 8(d) muestra que, al repetir el tratamiento dos veces, es posible mejorar la eficacia del tratamiento, definiéndose lo anterior como un alto porcentaje de células vivas destruidas usando una pequeña cantidad de magnetosomas. Es

más, para un tratamiento llevado a cabo dos veces, el porcentaje de células vivas del 20 % se alcanza para 0,25 mg de cadenas de magnetosomas usadas ( $B = 43$  mT) (Figura 8(d)), en comparación con 0,5 mg para un tratamiento llevado a cabo una vez ( $B = 43$  mT) (Figura 8(c)).

Se estimó también el porcentaje de inhibición de células MDA-MB-31 incubadas en presencia de los diversos tipos de nanopartículas mencionados anteriormente en ausencia de un campo magnético (Figura 9(a)) o en presencia de un campo magnético de 43 mT para un tratamiento llevado a cabo una vez (Figura 9(b)) o dos veces (Figura 9(c)). En todas las condiciones ensayadas, el porcentaje de inhibición de las células es mayor para las células MDA-MB-31 incubadas en presencia de las cadenas de magnetosomas que para aquellas incubadas en presencia de todos los demás tipos de nanopartículas (magnetosomas individuales, SPION@citratato y SPION@PEG). Se obtienen las mejores condiciones para el tratamiento (concretamente, aquellas que dan como resultado un alto porcentaje de inhibición en presencia de un campo magnético y un bajo porcentaje de inhibición en ausencia de un campo magnético) para la menor cantidad de cadenas de magnetosomas de 0,125 mg usada y para el tratamiento llevado a cabo más de una vez (Figuras 9(a) y 9(c)).

La Figura 9(d) muestra el porcentaje de células MDA-MD-231 que se vuelven magnéticas cuando se incuban en presencia de los diversos tipos de nanopartículas mientras se aplica el campo magnético alterno de 43 mT entre 0 y 20 minutos. El porcentaje de células magnéticas es alto para las células incubadas en presencia de cadenas de magnetosomas y de SPION@citratato. Se encuentra entre 40 y 90 %, dependiendo de cuánto tiempo se aplique el campo magnético alterno (Figura 9(d)). La Figura 9(d) muestra también que el porcentaje de internalización de los magnetosomas individuales en las células MDA-MD-231 es bajo ( $< 20$  %). Esto puede explicarse por la tendencia de los magnetosomas individuales a agregar, lo que previene que penetren en las células. Como se muestra en la Figura 9(d), las SPION@PEG poseen un muy bajo porcentaje de internalización en las células MDA-MD-231, indicando que el porcentaje de internalización de nanopartículas magnéticas en células eucarióticas después de la aplicación de un campo magnético alterno es fuertemente dependiente del tipo de nanopartículas usadas.

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- (i) En ausencia de tratamiento, la citotoxicidad de las cadenas de magnetosomas es baja para una cantidad de cadenas de magnetosomas menor de 1 mg.
- (ii) La fuerza de campo magnético de 43 mT suministra la mejor propiedad de calentamiento para células MDA-MB-231 suspendidas en presencia de cadenas de magnetosomas de diversas concentraciones.
- (iii) Se alcanzan las mejores condiciones para la menor cantidad de cadenas de magnetosomas incubadas (0,125 mg) y para el tratamiento repetido dos veces.
- (iv) El mayor porcentaje de inhibición alcanzada por las cadenas de magnetosomas en comparación con los magnetosomas individuales podría deberse a una mejor internalización de las cadenas de magnetosomas en las células MDA-MD-231 en comparación con la de los magnetosomas individuales.
- (v) El mayor porcentaje de inhibición observado para las células incubadas en presencia de cadenas de magnetosomas en comparación con el observado para las células incubadas en presencia de SPION@citratato puede explicarse por la mayor TAE de las cadenas de magnetosomas o por el calentamiento más homogéneo de las cadenas de magnetosomas o por una combinación de ambas de estas propiedades.

Ejemplo 5:

*Eficacia de calentamiento y actividad antitumoral de diversos magnetosomas bacterianos y SPION@citratato.*

En este ejemplo, se compara la eficacia de calentamiento *in vivo* y actividad antitumoral de cadenas de magnetosomas, magnetosomas individuales, SPION@citratato y bacterias magnetotácticas enteras.

Materiales y métodos:

Todos los experimentos animales se han realizado después de la aprobación de un protocolo examinado por el comité del "Centre Leon Bérard, Ecole normale supérieure, Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris", Lyon, Francia.

Se llevaron a cabo experimentos de calentamiento *in vivo* en 30 ratones atímicos de 6 semanas de edad que se compraron en Charles Rivers Laboratories, Arbreles, Francia. Para preparar animales portadores de tumor, se sometieron en primer lugar los ratones a radiación gamma. Se inyectaron entonces por vía subcutánea aproximadamente 2 millones de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 en 100  $\mu$ l de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en ambos flancos izquierdo y derecho de los ratones usando una jeringuilla (aguja 26G). Se midieron los tamaños tumorales usando calibres cada 3 días. Se llevaron a cabo entonces las estimaciones de los volúmenes de los tumores usando la fórmula  $V = A \times B^2 / 2$ , en que A es el diámetro lateral más largo y B el más corto del tumor (Sun *et al.*, *Cancer Lett.*, 2007, 258, 109-117). Los tumores crecieron durante un periodo de 21 días hasta que alcanzaron un volumen de aproximadamente 100  $\text{mm}^3$ .

Antes de empezar el tratamiento, se anestesiaron los ratones con ketamina/xilazina (100/6  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.), lo que dio como resultado una reducción de su temperatura corporal de 37 a 30-36°C, dependiendo del ratón. 3 ratones



murieron durante las primeras etapas del tratamiento, lo más probablemente debido a una sobreestimación de la dosis de anestésico. Después de la necropsia, los órganos de estos ratones no mostraron una congestión sistémica obvia ni infarto. Bajo anestesia, se insertó longitudinalmente en los tumores de los ratones la aguja de la jeringuilla que contenía nanopartículas sintetizadas químicamente o los diversos tipos de magnetosomas bacterianos dispersados en agua estéril. Se dispusieron entonces los ratones en una bobina de 6,7 cm de diámetro donde se les aplicó un campo magnético alterno. Para producir el campo magnético alterno, se generó una corriente alterna en la bobina usando una fuente de energía EasyHeat de 10 kW de Ambrell, Soultz, Francia. El diagrama esquemático de la Figura 10(a) muestra la configuración experimental usada para llevar a cabo los experimentos. Las medidas de la temperatura se llevaron a cabo usando una microsonda de termopar implantable (IT-18, Physitemp, Clifton, EE.UU.) para obtener la temperatura rectal o una estimación local de la temperatura en la parte central del tumor. Se monitorizó la variación de la temperatura rectal para verificar que el aumento de temperatura tumoral era local y no tenía lugar en todo el cuerpo de los ratones. Se usó una cámara de infrarrojos (Moblr2, Optophase, Lyon, Francia) para obtener una visión más global de la variación de temperatura del tumor y del entorno tumoral. La sección transversal a través de la cual se midió la temperatura se indica en el diagrama esquemático de la Figura 10(b) por una línea. Se midieron las variaciones de los tamaños tumorales durante los 30 días después del primer tratamiento tanto para los tumores no calentados como calentados.

Se estudió la actividad antitumoral siguiendo la evolución del tamaño de tumores crecidos de forma subcutánea en ambos flancos de cada ratón. Se seleccionaron aleatoriamente los ratones y se dividieron en 5 grupos. Se trataron los primeros 4 grupos como sigue. Se administraron 100  $\mu$ l de suspensiones que contenían magnetosomas individuales (suspensión 1 en los ratones 1 a 3), cadenas de magnetosomas (suspensión 2 en los ratones 5 a 8), SPION (suspensión 3 en los ratones 10 a 13) y bacterias magnetotáticas enteras (suspensión 4 en los ratones 15 y 16) a los tumores localizados en el flanco derecho de los ratones. Después de la inyección de las diferentes suspensiones, se sometieron los ratones a un campo magnético alterno de frecuencia 183 KHz y fuerza de campo magnético de ~43 mT (ratones 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13) u ~80 mT (ratones 15 y 16) durante 20 minutos. Se repitió el tratamiento 3 veces a intervalos de 3 días. Para los ratones que recibieron la suspensión de cadenas de magnetosomas, el campo magnético tuvo que reducirse a ~5 mT para evitar que la temperatura del tumor superara los 50°C. Para los ratones que recibieron las bacterias enteras, la fuerza de campo magnético tuvo que aumentarse a ~80 mT para observar un aumento de temperatura en el tumor. El quinto grupo se consideró un grupo de control y no se sometió a la aplicación de un campo magnético alterno. Este grupo estaba compuesto por ratones que recibieron en los tumores localizados en su flanco izquierdo 100  $\mu$ l de agua fisiológica (ratones 17 y 18), 100  $\mu$ l de suspensión 1 (ratones 4, 19 y 20), 100  $\mu$ l de suspensión 2 (ratones 9, 21, 20 y 22), 100  $\mu$ l de suspensión 3 (ratones 14, 23 y 24) y 100  $\mu$ l de suspensión 4 (ratones 25, 26, 27). Finalmente, se usaron los 27 tumores localizados en el flanco izquierdo de cada ratón como control interno y recibieron solo agua fisiológica.

Se eligieron las concentraciones de las diferentes suspensiones (10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para las suspensiones 1 a 3 y 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para la suspensión 2) de tal modo que suministraran propiedades de calentamiento similares en agua. Estas concentraciones representan la cantidad de maghemita contenida en 1 ml de agua. Se estimaron de tres modos diferentes, por medida de la absorbancia de las diferentes suspensiones a 480 nm, por pesada de la cantidad de nanopartículas o magnetosomas después de liofilización o por medida de la magnetización de saturación de 20  $\mu$ l de cada suspensión depositados sobre un sustrato usando una medida de magnetómetro SQUID (Alphandéry *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 12304-12309). Estos tres tipos diferentes de medidas suministraron la misma estimación de la concentración para las suspensiones que contenían magnetosomas individuales y SPION. Para la suspensión que contenía las cadenas de magnetosomas, la presencia de material biológico rodeando los magnetosomas bacterianos condujo a una sobreestimación de la concentración de maghemita por absorbancia y liofilización. Por lo tanto, se determinó la concentración de esta suspensión usando medidas de SQUID. Para el tratamiento con las bacterias magnetotáticas enteras, la concentración bacteriana inyectada fue de  $10^8$  células en 100  $\mu$ l. Se eligió la concentración de células bacterianas de modo que suministrara la misma concentración de óxido de hierro que la de la suspensión 2.

Se llevaron a cabo exámenes histológicos en el tumor subcutáneo, hígado, riñones y pulmones recogidos 30 días después de la primera inyección. Se fijaron las muestras con disolución de formalina al 10 %, se embebieron en parafina y se seccionaron en tiras de 4  $\mu$ m de grosor. Se tiñeron las secciones con hematoxilina-eosina (HE) y con azul de Berlín para detectar la presencia de magnetosomas bacterianos teñidos de azul. Se evaluó la necrosis de células neoplásicas, el número de mitosis para 3 campos seleccionados aleatoriamente a una ampliación de 400 x en zona no necrótica y la cantidad de células pigmentadas en secciones patológicas de los tumores localizados en el flanco derecho de los ratones.

Para arrojar luz sobre los exámenes histológicos y para estudiar la internalización de los magnetosomas en células tumorales, se sembraron  $5\cdot 10^5$  células de carcinoma de mama (estirpes MDA-MB-231) sobre cubreobjetos de microscopio. Crecieron durante 48 horas a 37°C con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se trataron adicionalmente las células en presencia de diversas suspensiones de magnetosomas durante 1 a 24 horas en ausencia o en presencia de un campo magnético de 0,6 mT. Se usaron 2 ml de dos de las suspensiones de magnetosomas que contenían magnetosomas individuales o cadenas de magnetosomas mezclados en el medio de crecimiento celular. Para evitar una citotoxicidad demasiado alta de las células, se mantuvo la concentración de óxido de hierro de las dos suspensiones de magnetosomas baja a ~130  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Después del tratamiento, se lavaron las células con PBS para retirar los magnetosomas bacterianos que rodeaban las células. Se fijaron entonces las células usando

paraformaldehído al 5 % y se incubaron en presencia de una disolución que se colorea con azul de Prusia en presencia de hierro. Esta disolución contiene un 5 % de ferrocianato de potasio y un 10 % de ácido clorhídrico (equivolumen). Se observaron entonces las células usando un objetivo suspendido (100x). Se ajustó la focalización del objetivo para detectar la presencia de hierro en las células y no en la superficie celular.

## 5 Resultados y discusión:

En el primer conjunto de ratones, se inyectó la suspensión que contenía los magnetosomas individuales y se aplicó el campo magnético alterno. Como resultado, la temperatura en los ratones con tumores aumentó en 4°C de 31 a 35°C (Figura 10(c)). Después de 10 min de calentamiento, las medidas de infrarrojo mostraron que la difusión de temperatura en el tumor es de ~0,5 cm, en que esta distancia se estima midiendo la anchura total semimáxima de la distribución de temperatura mostrada en la Figura 10(d). Se muestran las evoluciones de los tamaños de los tumores tratados en la Figura 10(e). Estos tamaños aumentaron en los ratones 1 a 3 durante los 30 días después del tratamiento, indicando la ausencia de actividad antitumoral. El aumento del tamaño de los tumores tratados puede observarse también en el ratón 3 examinando el conjunto de tres fotografías tomadas durante el día de tratamiento (D0), 14 días después del tratamiento (D14) y 30 días después del tratamiento (D30) (Figura 11(a)). Se confirmó adicionalmente la ausencia de actividad antitumoral en estos ratones por los comportamientos de los tumores que no recibieron los magnetosomas individuales (Figura 10(f)). Los tamaños de estos tumores aumentaron a una tasa similar que los de los tumores tratados (Figuras 10(e) y 10(f)). Cuando se inyectó la suspensión 1 sin aplicación de un campo magnético (en el ratón 4 y en otros dos ratones), aumentó también el tamaño tumoral (Figura 10(f)). En conjunto, estos resultados indican que ni la presencia de magnetosomas individuales ni el calor que generan en presencia de un campo magnético producen actividad antitumoral.

Los exámenes patológicos del tumor localizado en el flanco derecho del ratón 2 confirmaron adicionalmente esta conclusión. Mostraron una masa importante de células necróticas en tumores recogidos 30 días después del primer tratamiento. Las mitosis eran numerosas e indicaban una actividad proliferativa tumoral importante con una media de 12 mitosis por campo seleccionado de 300  $\mu\text{m}^2$  de tamaño. La tinción con azul de Berlín de una sección patológica obtenida a partir del tumor derecho mostró la presencia de puntos oscuros difusos (Figura 11(b)). Estos puntos se supone que surgen de agregados de magnetosomas como se muestra en las vistas ampliadas (Figuras 11(c) y 11(d)). El análisis histológico de los órganos mostró que no se encontraban magnetosomas individuales en hígado, riñones y pulmones. La ausencia de magnetosomas individuales en estos órganos sugiere que permanecen localizados en los tumores 30 días después de la inyección, probablemente debido a su tendencia a agregar.

Para estudiar si los magnetosomas individuales penetran en células de carcinoma, se incubaron estas últimas en presencia de una suspensión de magnetosomas individuales. Después de 1 hora de incubación, había solo unas pocas trazas de magnetosomas individuales localizados dentro de las células tanto en ausencia como en presencia de un campo magnético. Después de 24 horas de incubación de las células, no se observaron más trazas de magnetosomas individuales tanto en ausencia como en presencia de un campo magnético. Esto sugiere que los magnetosomas individuales no penetran fácilmente en las células tumorales. Cuando penetran, no permanecen localizados en estas células durante un periodo largo de tiempo.

En el segundo conjunto de ratones, se inyectó la suspensión que contiene las cadenas de magnetosomas. Inesperadamente, la aplicación del campo magnético produjo un mayor aumento de la temperatura que el observado en el primer conjunto de ratones. A los 20 min, la temperatura en el tumor aumentó en 10°C de 33 a 43°C (Figura 12(a)). Además, las imágenes de infrarrojo muestran una mayor difusión de temperaturas a lo largo de la sección transversal del tumor. La Figura 12(b) muestra que la anchura total semimáxima de la distribución de temperatura es de 0,75 cm, sugiriendo una distribución de temperatura más homogénea en los tumores para las cadenas de magnetosomas que para los magnetosomas individuales. En contraposición con los comportamientos observados con los magnetosomas individuales, la actividad antitumoral era clara en este caso. La Figura 12(c) muestra que los tamaños de los tumores tratados no aumentaban fuertemente como se observa para los tumores no tratados (Figura 12(d)). El tumor tratado desaparecía completamente en el ratón 5 y se reducía muy significativamente de tamaño en el ratón 6 (Figura 12(c)). La desaparición del tumor tratado en el ratón 5 puede observarse examinando el conjunto de tres fotografías tomadas durante el día de tratamiento (D0), 14 días después del tratamiento (D14) y 30 días después del tratamiento (D30) (Figura 13(a)). Además, los exámenes histológicos mostraron que no permanecían tejidos tumorales en el ratón 5. Los exámenes patológicos de los tumores tratados mostraron que el número de mitosis observadas era bajo (4 de media por campo seleccionado de 300  $\mu\text{m}^2$ ), indicando una reducción de la actividad de proliferación tumoral. En el ratón 9 y otros dos ratones, en que se inyectó la suspensión de cadenas de magnetosomas sin aplicación del campo magnético, el tamaño tumoral aumentó fuertemente durante los 30 días después del primer tratamiento (Figura 12(d)). Esto indica que la actividad antitumoral era debida al calor liberado por las cadenas de magnetosomas cuando se exponían a un campo magnético alterno. Una micrografía de tejido tumoral muestra una distribución más homogénea de las cadenas de magnetosomas en comparación con la de los magnetosomas individuales (Figuras 11(d) y 13(b)). Además, las ampliaciones de la Figura 13(b), que se muestran en la Figuras 13(c) y 13(d), muestran una región negra que rodea el núcleo celular. Esto sugiere que las cadenas de magnetosomas han penetrado en las células (un resultado que está de acuerdo con la conclusión extraída en el ejemplo 4). Los exámenes histológicos de los órganos sugieren también la presencia de cadenas esporádicas de magnetosomas que se detectaban en hepatocitos y células hepáticas perivasculares, pero no en riñones y pulmones. A pesar de la acumulación de cadenas de magnetosomas en células hepáticas, no se observaron

lesiones en el hígado.

Para confirmar los resultados obtenidos a partir de los exámenes histológicos, se incubaron las cadenas de magnetosomas *in vitro* en presencia de células de carcinoma. Después de 1 hora de incubación, se observó más claramente la presencia de las cadenas de magnetosomas en las células que la de magnetosomas individuales, tanto en ausencia como en presencia de un campo magnético. Para un tiempo de incubación de las células de 24 horas, la presencia de las cadenas de magnetosomas en las células se vuelve aún más pronunciada. En presencia de un campo magnético, las cadenas de magnetosomas se localizan alrededor del núcleo celular mientras que, en ausencia de un campo magnético, se dispersan más aleatoriamente las cadenas de magnetosomas en los diferentes compartimentos celulares. Estos resultados sugieren que puede ser posible direccionar hacia las células tumorales con un campo magnético usando cadenas de magnetosomas.

En el tercer conjunto de ratones, se inyectó una suspensión de SPION en los tumores localizados en el flanco derecho de los ratones. La aplicación del campo magnético produjo un aumento ligeramente menor de temperatura que el observado con las cadenas de magnetosomas. A los 20 minutos, la temperatura en el tumor aumentó en 6°C de 36 a 42°C (Figura 18(a)). La anchura total semimáxima de la distribución de la temperatura estimada por medidas de infrarrojo (0,75 cm, Figura 18(b)) era la misma que la observada con las cadenas de magnetosomas. En este caso, los tamaños de los tumores tratados se redujeron muy fuertemente en los ratones 10 y 12 (Figura 18(c)), pero los exámenes histológicos mostraron la presencia de nódulos linfáticos peritumorales, sugiriendo que la actividad antitumoral era solo parcial en estos ratones. En los ratones 11 y 13, los tamaños de los tumores no tratados y tratados aumentaron a una tasa similar no mostrando actividad antitumoral obvia (Figura 18(c) y 18(d)). En el ratón 14 y en otros dos ratones en que se inyectó SPION sin aplicación de un campo magnético, se observó un fuerte aumento del tamaño tumoral durante el periodo de 30 días después de la inyección (Figura 18(d)). Como en el segundo conjunto de ratones en que se inyectó la suspensión de cadenas de magnetosomas, el número medio de mitosis era bajo (5 de media por campo seleccionado de 300  $\mu\text{m}^2$ ) y la actividad necrótica era comparable con la observada en el grupo de control. Según la tinción con azul de Berlín, las SPION, que se tiñeron de azul, se encontraban en hígado, células de Küpffer, macrófagos y senos de nódulos linfáticos pulmonares. Ya se ha observado la presencia de SPION en los pulmones (Zhou *et al.*, *Biomaterials*, 2006, 27, 2001-2008). Es señal de toxicidad potencial y es por lo tanto una desventaja para el desarrollo de una termoterapia tal como se describe en esta divulgación.

En el cuarto conjunto de ratones, se inyectaron  $10^8$  células contenidas en 100  $\mu\text{l}$  de PBS en los tumores localizados en el flanco derecho de los ratones y se aplicó un campo magnético de ~80 mT. En estas condiciones, la temperatura aumentó en solo 4°C de 33 a 37°C en 20 min. El aumento de temperatura se observó también usando medidas de infrarrojo. Como en el grupo tratado con magnetosomas individuales, los tamaños de los tumores tratados aumentaron durante los 30 días después del tratamiento. El examen histológico reveló un área pigmentada en el tumor tratado con una alta actividad mitótica (15 mitosis de media por campo seleccionado de 300  $\mu\text{m}^2$ ), indicando la ausencia de actividad antitumoral. No se encontraron bacterias magnetotácticas en hígado, riñones ni pulmones.

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- (i) No se observó actividad antitumoral cuando se inyectaron las suspensiones que contienen magnetosomas individuales, cadenas de magnetosomas y SPION@citrato en los tumores de los ratones sin aplicación de un campo magnético.
- (ii) Cuando se administraron los magnetosomas individuales a los tumores al inicio del tratamiento, se observaron una baja capacidad de calentamiento *in vivo* y nada de actividad antitumoral. Esto era inesperado en vista de la capacidad de calentamiento observada en disolución (Ejemplo 2).
- (iii) En contraposición, cuando se administraron las cadenas de magnetosomas a los tumores para iniciar el tratamiento, se observó una actividad antitumoral significativa cuando se calentaban. Este comportamiento puede explicarse por su alta eficacia de calentamiento *in vivo*, por su distribución homogénea en el tumor de los ratones y también por su facultad de penetrar en las células tumorales.
- (iv) Las SPION, que se usan actualmente para tratamiento de hipertermia, mostraron también actividad antitumoral. Sin embargo, su actividad antitumoral era menos pronunciada que la obtenida con las cadenas de magnetosomas. Además, los datos experimentales se obtuvieron para una suspensión de SPION con una concentración de óxido de hierro que era el doble de la usada con la suspensión que contiene las cadenas de magnetosomas. Para dos suspensiones con una concentración de óxido de hierro similar, se observa mucha menos eficacia de calentamiento y antitumoral para la administración de la suspensión que contiene SPION que para la que contiene las cadenas de magnetosomas (Ejemplo 6).

Ejemplo 6:

*Eficacia de calentamiento y actividad antitumoral de cadenas de magnetosomas preparadas cultivando las bacterias magnetotácticas en ausencia o en presencia de EDTA en comparación con SPION@PEG y SPION@citrato.*

En este ejemplo, se comparan la eficacia de calentamiento y la actividad antitumoral de cadenas de magnetosomas extraídas de bacterias magnetotácticas, que se han preparado cultivando las bacterias en ausencia de un agente

quelante o en presencia de EDTA 0,4  $\mu$ M. Además, se comparan también la eficacia de calentamiento y actividad antitumoral de estos dos tipos de magnetosomas bacterianos con aquellas de SPION@PEG y SPION@cittrato usados por otros grupos para llevar a cabo hipertermia magnética.

#### Materiales y métodos:

5 El protocolo experimental es muy similar al descrito en el ejemplo 5, excepto porque en este caso se inyectan los diferentes tipos de nanopartículas solo una vez al inicio del tratamiento. Se inyectaron en primer lugar 100  $\mu$ l de las cuatro suspensiones diferentes que contienen 10 mg/ml de óxido de hierro de los diferentes tipos de nanopartículas en los tumores localizados en el flanco derecho de los ratones. Los tumores localizados en el flanco izquierdo de los ratones se usaron como control interno. Se inició el tratamiento inducido por calor aplicando un campo magnético

10 alterno de frecuencia 183 kHz y amplitud de campo de 43 mT. En un caso, concretamente para los magnetosomas preparados en presencia de EDTA, se redujo la fuerza del campo magnético por debajo de 43 mT para evitar que la temperatura superara los 50°C. Se repitió el tratamiento 3 veces a intervalos de 3 días. Se midió el tamaño del tumor durante los 30 días después del tratamiento para evaluar la eficacia de la terapia.

Se prepararon las suspensiones que contenían las cadenas extraídas de magnetosomas, SPION@PEG y SPION@cittrato como se describe en el ejemplo 1. Se cultivaron bacterias magnetotáticas AMB-1 en presencia o en ausencia de EDTA 0,4  $\mu$ M y se extrajeron las cadenas de magnetosomas siguiendo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo 1. Las cadenas de magnetosomas preparadas cultivando las bacterias magnetotáticas en ausencia de EDTA se designan como "cadenas estándares de magnetosomas" o CM, mientras que aquellas preparadas cultivando las bacterias magnetotáticas en presencia de EDTA 0,4  $\mu$ M se designan como magnetosomas-EDTA o CM (EDTA 0,4  $\mu$ M). Los magnetosomas-EDTA se caracterizan por magnetosomas mayores, por cadenas más largas de magnetosomas y por una mayor capacidad de calentamiento (cuando se mezclan con agua) que las CM como se muestran en el ejemplo 3.

15

20

#### Resultados y discusión:

Cuando se inyecta 1 mg de una suspensión que contiene CM al tumor y se aplica el campo magnético alterno, la Figura 14(a) muestra que la temperatura en el tumor alcanza los 50°C después de 4 minutos de tratamiento. Durante los 30 días después del tratamiento, la Figura 14(b) muestra que el volumen tumoral normalizado, que se promedia entre los diferentes ratones tratados, aumenta mucho menos que el volumen del tumor tratado. Para el ratón que se ha tratado más eficazmente, el tumor desaparece completamente como se indica por la variación del volumen tumoral en este ratón (Figura 15(b)) y por la fotografía de este tumor tomada 30 días después del tratamiento (Figura 15(a)). Se observa una clara actividad antitumoral con las CM, confirmando por ello los resultados presentados en el ejemplo 5. Cuando se administra la suspensión de magnetosomas-EDTA al tumor y se aplica el campo magnético, la temperatura en el tumor aumenta más rápidamente que después de la administración de las CM como se observa comparando las Figuras 14(a) y 14(c). Este comportamiento está de acuerdo con el hecho de que los magnetosomas-EDTA poseen una mayor capacidad de calentamiento que las CM cuando se mezclan en disolución (ejemplo 3). Sin embargo, a pesar del hecho de que los magnetosomas-EDTA muestran una mejor capacidad de calentamiento *in vivo* que las CM, su actividad antitumoral es menor. Es más, la Figura 14(d) muestra que el volumen de tumor tratado con magnetosomas-EDTA aumenta más que el del tumor tratado con las CM (Figura 14(b)).

25

30

35

La Figura 15 representa los comportamientos de los ratones para los que los tratamientos fueron más eficaces en cada grupo. Se observó una desaparición completa del tumor con las CM y con los magnetosomas-EDTA (Figuras 15(c) y 15(d)), sugiriendo una actividad antitumoral para las cadenas de magnetosomas de diversas longitudes.

40

Cuando se administra 1 mg de una suspensión que contiene SPION@cittrato al tumor y se aplica el campo magnético alterno de 43 mT, la Figura 14(e) muestra que la temperatura aumenta en 4°C en 2 minutos, que es mucho menos que el aumento de temperatura observado para las CM (12°C en 2 minutos) o los magnetosomas-EDTA (20°C en 2 minutos). En este caso, el volumen de tumor tratado aumenta a la misma tasa que el del tumor no tratado durante los días después del tratamiento (Figura 14(f)) y ninguno de los ratones muestra una desaparición completa del tumor durante los 30 días después del tratamiento. Para un ratón típico tratado con SPION@cittrato, el tumor sigue allí 30 días después del tratamiento (Figuras 15(e) y 15(f)). Esto indica un tratamiento menos eficaz que el que implica las cadenas de magnetosomas. Para la inyección de SPION@PEG, la temperatura en el tumor de los ratones no aumenta en absoluto después de la aplicación del campo magnético como se muestra en la Figura 14(g) y ninguno de los tumores reduce su tamaño durante los días después del tratamiento (Figuras 14(h), 15(g) y 15(h)).

45

50

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- (i) Cuando se administran diversas suspensiones de nanopartículas que contienen la misma cantidad de óxido de hierro, las suspensiones que contienen las cadenas extraídas de magnetosomas muestran una mejor eficacia de calentamiento y actividad tumoral que aquellas que contienen SPION@PEG y SPION@cittrato.
  - (ii) La mayor actividad antitumoral producida por las CM en comparación con los magnetosomas-EDTA puede explicarse por una mejor captación intracelular de las CM que de los magnetosomas-EDTA. Esto es debido lo más probablemente a la diferencia en las longitudes de cadena entre estos dos tipos de magnetosomas.
- 55

Puesto que la hipertermia intracelular se cree que es un mecanismo más eficaz de destrucción celular que la hipertermia extracelular, esta diferencia en la internalización entre estos dos tipos de magnetosomas podría explicar la diferencia en actividad antitumoral.

Ejemplo 7:

#### 5 Biodistribución de diversos magnetosomas bacterianos en ratones

En este ejemplo, se estudia la biodistribución de diversos tipos de partículas (cadenas de magnetosomas, magnetosomas individuales, SPION@citratato y SPION@PEG) contenidas en los diferentes órganos del ratón justo después de la inyección, 3 días, 6 días o 14 días después de la inyección. Para este estudio, se inyectaron diversas suspensiones que contenían 1 mg de cada tipo de las nanopartículas mencionadas anteriormente por vía intratumoral, concretamente, directamente en los tumores del ratón.

Se muestra solo el porcentaje de partículas en los tumores y heces de los ratones, puesto que las partículas se encontraron esencialmente allí. Para las estimaciones del porcentaje de partículas en los tumores, se llevaron a cabo dos tipos de medidas magnéticas (MIAték y SQUID). Además de estos dos tipos de medidas, se midió la tasa de absorción específica (TAE) de las diversas partículas *ex vivo* para los tumores calentados bajo la aplicación del campo magnético alterno. Puesto que la TAE es inversamente proporcional a la cantidad de partículas calentadas (véase el ejemplo 2), esta medida posibilita una estimación de la cantidad de partículas inyectadas en los tumores.

Materiales y método:

Se llevó a cabo la inducción de tumor de mama humano como se reseña anteriormente en el ejemplo 5. Brevemente, 54 ratones atómicos Swiss hembra de 6 semanas de edad (Charles River, Arbresle, Francia) recibieron por inyección subcutánea 2 millones de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (Cailleau *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1974, 53, 661-674) tanto en el flanco izquierdo como derecho. La inyección de los diversos tipos de partículas se llevó a cabo 14 días después de la implantación del tumor. Se preparó una suspensión de cadenas de magnetosomas, magnetosomas individuales, SPION@citratato y SPION@PEG (Micromod, Rostock-Warnemuende, Alemania) a una concentración de 1 mg de Fe/ml. Se inyectaron 100 µl de estas suspensiones directamente en los tumores localizados en el flanco derecho a una dosis de 1 mg de maghemita. Se midió la cantidad de maghemita contenida en los diferentes órganos de los ratones durante el día de la inyección (día 0, D0), 3 días después de la inyección (día 3, D3), 6 días después de la inyección (día 6, D6) o 14 días después de la inyección (día 14, D14). En diferentes días (D0, D3, D6 y D14), se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se recogieron inmediatamente los tejidos u órganos de interés (sangre, hígado, bazo, pulmones, riñones, tumor y heces), se pesaron y se congelaron a 4°C hasta el análisis. En primer lugar, se ensayó *ex vivo* la eficacia de calentamiento de los diferentes tumores que contenían los diversos tipos de partículas y recogidos en diferentes días. Para eso, se insertó el tejido tumoral en un tubo, que se colocó dentro de una bobina donde se aplicó un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo de 43 mT durante 20 minutos (EasyHeat de 10 kW, Ambrell, Soultz, Francia). Se midió la temperatura en el tumor usando una microsonda de termopar implantable (IT-18, Physitemp, Clifton, EE.UU.). En segundo lugar, se determinó la cantidad de maghemita usando un instrumento, MIAték®, que se ha desarrollado por la compañía Magnisense (Nikitin *et al.*, 2007, *J. Magn. Mater.*, 311, 445). Esta tecnología posibilita una detección sensible y una cuantificación precisa de nanopartículas magnéticas en una diana biológica. Para las medidas con MIAték®, se prepararon los tejidos mediante homogeneización mecánica en agua ultrapura (16 % de peso húmedo de heces, concretamente 16 g de heces diluidos en 100 ml de PBS, 25 % de peso húmedo de tumor, 50 % de peso húmedo de riñón, pulmón y bazo y 100 % de peso húmedo de hígado). Se dispusieron 100 µl de tejidos preparados de este modo en el sistema de detección (MIAték®). Se llevó a cabo la calibración midiendo la señal de MIAték® de suspensiones que contenían cadenas de magnetosomas, magnetosomas individuales, SPION@citratato y SPION@PEG mezclados con agua en función de la concentración de maghemita de estas suspensiones, que variaba entre 15 µg/ml y 125 µg/ml. Para verificar las estimaciones de las concentraciones de maghemita con MIAték®, se llevaron a cabo medidas con SQUID de las muestras que contenían el mayor porcentaje de maghemita (tumores y heces). Para ello, se estimó la magnetización de saturación de los diferentes tumores y heces que contienen los diversos tipos de partículas. A partir de esta estimación, podría deducirse la cantidad de maghemita presente en las diferentes muestras usando la magnetización de saturación de la maghemita bruta (80 Am<sup>2</sup>/kg). Las estimaciones deducidas a partir de las medidas de MIAték® se compararon con aquellas deducidas a partir de las medidas de SQUID. Finalmente, se calentaron *ex vivo* los diferentes tumores que contenían los diversos tipos de partículas bajo la aplicación de un campo magnético alterno de frecuencia 183 kHz y fuerza de campo de 43 mT. A partir de las curvas de calentamiento, podría deducirse la TAE midiendo las pendientes a 25°C y por ello la cantidad de maghemita contenida en los diferentes tumores (Ejemplo 2).

Se obtuvieron las estimaciones de la cantidad de maghemita contenida en los diferentes tumores recogiendo un quinto del volumen tumoral total después de la homogeneización de las partículas en los tumores. Lo más probablemente debido a una homogeneización no uniforme, el tumor recogido no contiene un quinto de la cantidad de los diversos tipos de partículas inyectadas. Esto da como resultado grandes barras de error en las medidas y, en algunos casos, la detección de más partículas en el tumor que la cantidad que se había inyectado. Sin embargo, a pesar de estas incertidumbres, las conclusiones principales extraídas de este estudio siguen siendo válidas.

## Resultados y discusión:

La Figura 16(a) muestra la biodistribución de las cadenas de magnetosomas en los tumores (estimadas como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido) justo después de la inyección (D0), 3 días después de la inyección (D3), 6 días después de la inyección (D6) y 14 días después de la inyección (D14). Los tres tipos de medidas (MIAtek®, TAE y SQUID) muestran esencialmente la misma tendencia: la reducción rápida del porcentaje de cadenas de magnetosomas contenidas en los tumores durante los días siguientes a la inyección (Figura 16(a)). Es más, se eliminaban más del 90 % de las cadenas de magnetosomas 14 días después de la inyección. Se encontraron cadenas de magnetosomas esencialmente en las heces, con 10-15 % en las heces el primer día después de la inyección y 15-20 % a los 3 días, 6 días y 14 días después de la inyección (Figura 16(b)). Con las cadenas de magnetosomas, se mostró que la vía de eliminación era esencialmente fecal. Se encontraron solo unas pocas trazas de cadenas de magnetosomas (< 0,1 % DI/g de tejido) en pulmón, riñón, hígado y bazo el tercer y sexto días después de la inyección. No se encontraron cadenas de magnetosomas en la sangre. Estos resultados sugieren que las cadenas de magnetosomas se excretaban rápidamente en su forma nativa.

Para la inyección de magnetosomas individuales, se muestra el porcentaje de dosis inyectada (DI) por gramo de tejido en la Figura 16(c) en diferentes días después de la inyección. Como con las cadenas de magnetosomas, existe un acuerdo relativamente bueno entre los tres tipos diferentes de medidas (MIAtek®, TAE y SQUID). El porcentaje de magnetosomas individuales contenidos en el tumor parece reducirse mucho menos significativamente durante los días después del tratamiento que el de las cadenas de magnetosomas (Figuras 16(a) y 16(c)). Como con las cadenas de magnetosomas, se encontraron magnetosomas individuales en las heces, pero con un porcentaje menor (entre 5 y 10 % a D3, D6 y D14). La vía de eliminación del magnetosoma individual parece que es también (al menos parcialmente) la excreción fecal.

Se estudió también la biodistribución de SPION@citrat y SPION@PEG sintetizados químicamente. Como se muestra en las Figuras 16(e) y 16(g), SPION@citrat y SPION@PEG parecen permanecer en los tumores 14 días después de la inyección. El porcentaje de nanopartículas en los tumores no se reduce durante los días después del tratamiento tan significativamente como con las cadenas de magnetosomas. Además, SPION@citrat y SPION@PEG no se han detectado en las heces de los ratones. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que SPION@citrat y SPION@PEG se metabolizan a hierro libre y por lo tanto no se eliminan en las heces como nanopartículas. Esto sería más bien una desventaja de estas nanopartículas sintetizadas químicamente en comparación con los magnetosomas, puesto que el hierro libre puede causar estrés oxidativo (Puntarulo *et al.*, 2005, *Mol. Aspects, Med.*, 299-312).

A partir de estos resultados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

Las cadenas de magnetosomas dejan rápidamente el tumor y parecen eliminarse en las heces. Estas dos propiedades son favorables para el desarrollo de la termoterapia descrita en esta divulgación. Podría intentar explicarse este comportamiento por el hecho de que las cadenas de magnetosomas no agregan fuertemente. En contraposición con las cadenas de magnetosomas, un gran porcentaje de magnetosomas individuales permanecen en el tumor 14 días después de la inyección, lo que sugiere que el organismo podría encontrar más difícil eliminarlos rápidamente. Podría intentar explicarse este comportamiento por el hecho de que los magnetosomas individuales agregan. Un gran porcentaje de las nanopartículas sintetizadas químicamente (SPION@citrat y SPION@PEG) permanecen en el tumor 14 días después de la inyección y ninguna de ellas se encuentra en las heces. Esto sugiere que estas nanopartículas sintetizadas químicamente no dejan rápidamente los tumores y que se metabolizan a hierro y/o que se eliminan en la orina. Estos rasgos las hacen candidatos a fármaco potencialmente menos atractivos que las cadenas de magnetosomas.

## REIVINDICACIONES

1. Cadenas de magnetosomas bacterianos aislados de bacterias magnetotáticas, en las que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena, para uso en el tratamiento de tumores por terapia térmica, de preferencia de un tumor sólido.
- 5 2. Cadenas según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de tumores por terapia térmica, en las que las cadenas de magnetosomas se someten a un campo magnético alterno suministrando la generación de calor.
3. Cadenas para uso según la reivindicación 1 o 2, en las que las cadenas de magnetosomas contienen al menos 2 magnetosomas, preferiblemente de 2 a 30 magnetosomas, más preferiblemente de 4 a 20 magnetosomas.
- 10 4. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que los magnetosomas contenidos en las cadenas poseen tamaños que se encuentran entre 10 y 120 nm, preferiblemente entre 10 y 70 nm, lo más preferiblemente entre 30 y 50 nm.
5. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en las que las cadenas de magnetosomas se han obtenido a partir de bacterias magnetotáticas que se cultivaron en un medio de crecimiento que contenía hierro y/u otro metal de transición tal como cobalto, níquel, cobre, cinc, manganeso o cromo.
- 15 6. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en las que las cadenas de magnetosomas se han obtenido a partir de bacterias magnetotáticas que se cultivaron en un medio de crecimiento que contiene un agente quelante, preferiblemente elegido entre bisfosfonatos, rodamina y EDTA.
7. Cadenas, para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en las que las cadenas de magnetosomas poseen un agente unido a los magnetosomas y/o incorporado a los magnetosomas que se usa para visualizar las cadenas de magnetosomas, siendo ventajosamente dicho agente un fluoróforo o un fluoróforo y un agente quelante, preferiblemente rodamina.
- 20 8. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que las cadenas de magnetosomas se encapsulan en una vesícula, usándose preferiblemente dicha vesícula en combinación con un principio activo.
- 25 9. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el tratamiento de las células tumorales o del tumor es por hipertermia.
10. Cadenas para uso según la reivindicación 9, en las que la temperatura de tratamiento se encuentra entre 37 y 45°C, preferiblemente entre 40 y 45°C, lo más preferiblemente a 43°C.
- 30 11. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el tratamiento de las células tumorales es por termoablación.
12. Cadenas para uso según la reivindicación 11, en las que la temperatura de tratamiento se encuentra entre aproximadamente 45 y aproximadamente 100°C, preferiblemente entre aproximadamente 45 y aproximadamente 70°C, más preferiblemente entre aproximadamente 45 y aproximadamente 55°C, lo más preferiblemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 55°C.
- 35 13. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que la frecuencia del campo magnético se encuentra entre 50 y 1000 kHz, preferiblemente entre 100 y 500 kHz, más preferiblemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 kHz.
- 40 14. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que la amplitud del campo magnético se encuentra entre 0,1 y 200 mT, preferiblemente entre 1 y 100 mT, más preferiblemente entre 10 y 50 mT.
15. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el campo magnético se aplica durante un periodo de tiempo que varía entre 1 segundo y 6 horas, preferiblemente entre 1 minuto y 1 hora o entre 0,5 minutos y 30 minutos, lo más preferiblemente entre 1 minuto y 30 minutos.
- 45 16. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el proceso de calentamiento se repite.
17. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que se lleva a cabo el direccionamiento hacia el (los) tumor(es) o célula(s) tumoral(es) de las cadenas de magnetosomas usando un campo magnético.
- 50 18. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que se realiza el direccionamiento hacia el (los) tumor(es) ligando una molécula directora biológica y/o química que dirige hacia el (los) tumor(es), tal como un anticuerpo y/o una molécula de PEG y/o ácido fólico, las cadenas de magnetosomas o la

vesícula que contiene las cadenas de magnetosomas.

19. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que se aplica el campo magnético alterno para mejorar la penetración de las cadenas de magnetosomas en las células tumorales.
- 5 20. Cadenas para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que dicho tumor se selecciona de cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de cerebro y cáncer de piel.
21. Un kit que comprende cadenas de magnetosomas bacterianos y un dispositivo que es capaz de generar un campo magnético alterno.
22. El kit según la reivindicación 21, en el que las cadenas de magnetosomas se encapsulan en una vesícula.
- 10 23. Un método para la producción de cadenas de magnetosomas en el que se cultivan bacterias magnetotáticas en un medio de crecimiento que contiene al menos una fuente de hierro y un agente quelante.
24. Cadenas de magnetosomas bacterianos aislados de bacterias magnetotáticas en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena para uso como fármaco.
- 15 25. Cadenas de magnetosomas bacterianos aislados de bacterias magnetotáticas en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena para uso como dispositivo médico.
- 20 26. Cadenas de magnetosomas bacterianos aislados de bacterias magnetotáticas en que la mayoría de los magnetosomas poseen direcciones cristalográficas orientadas en la dirección del alargamiento de cadena, obtenibles mediante el proceso de la reivindicación 23.



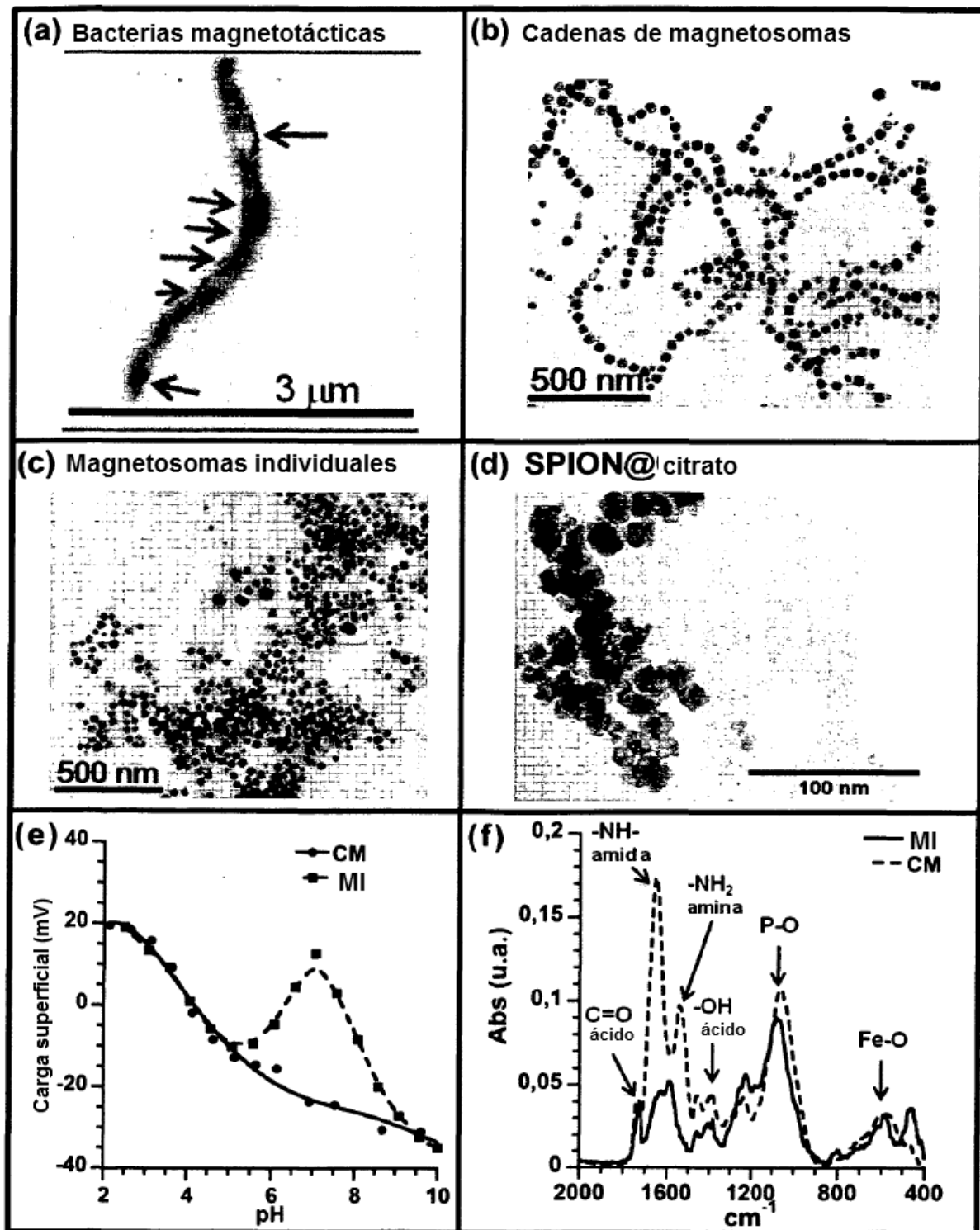


Fig. 1

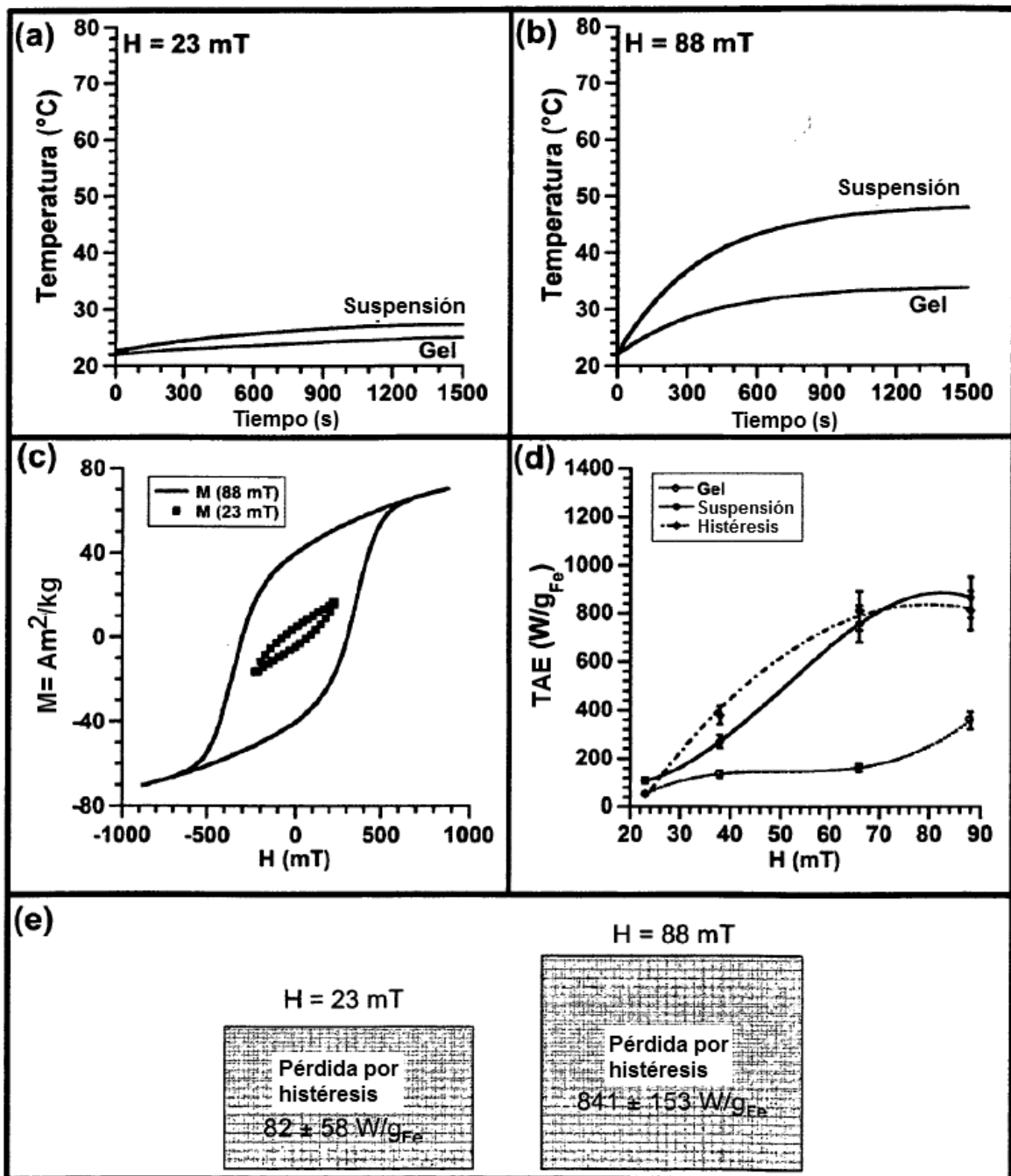


Fig. 2

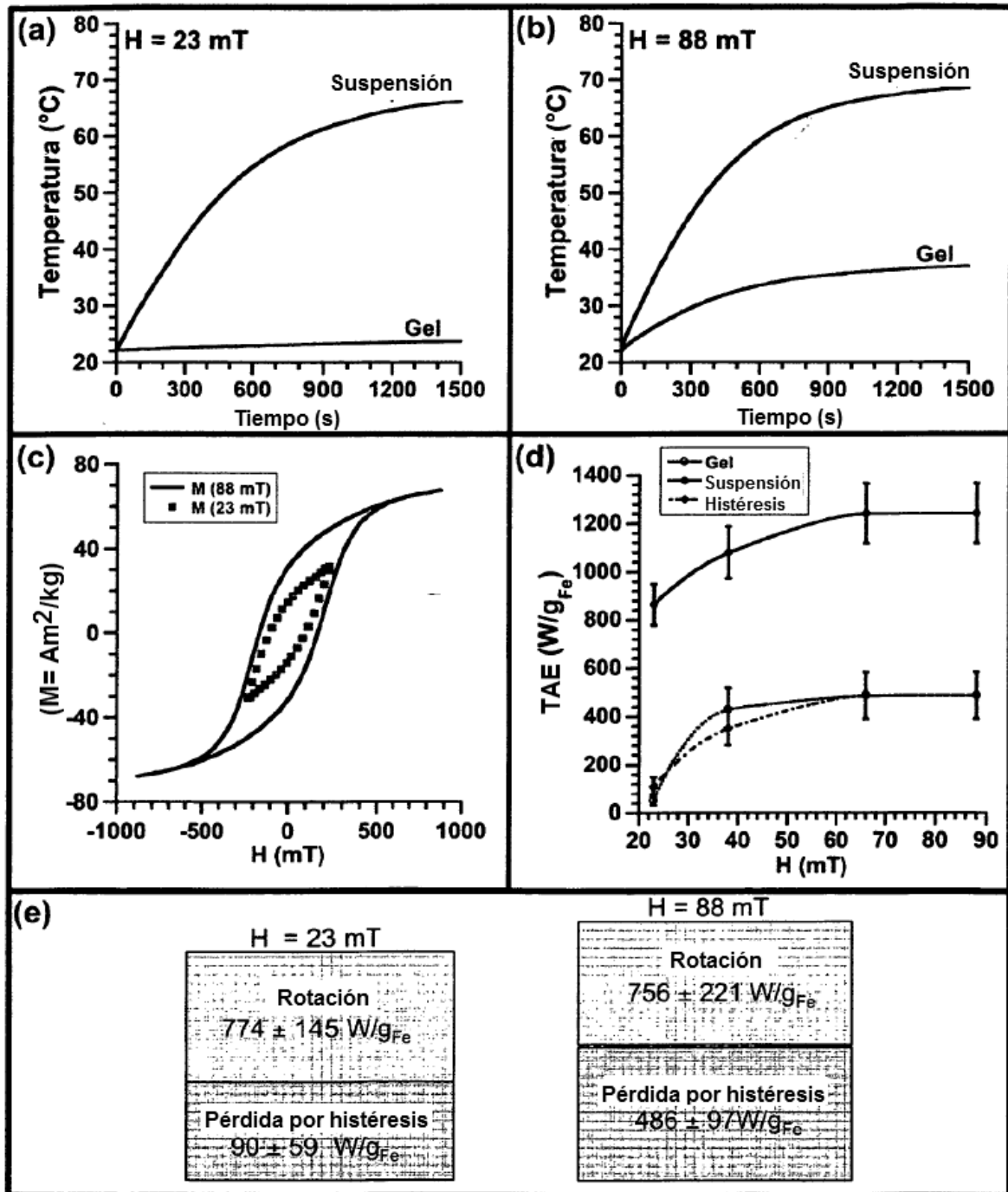


Fig. 3

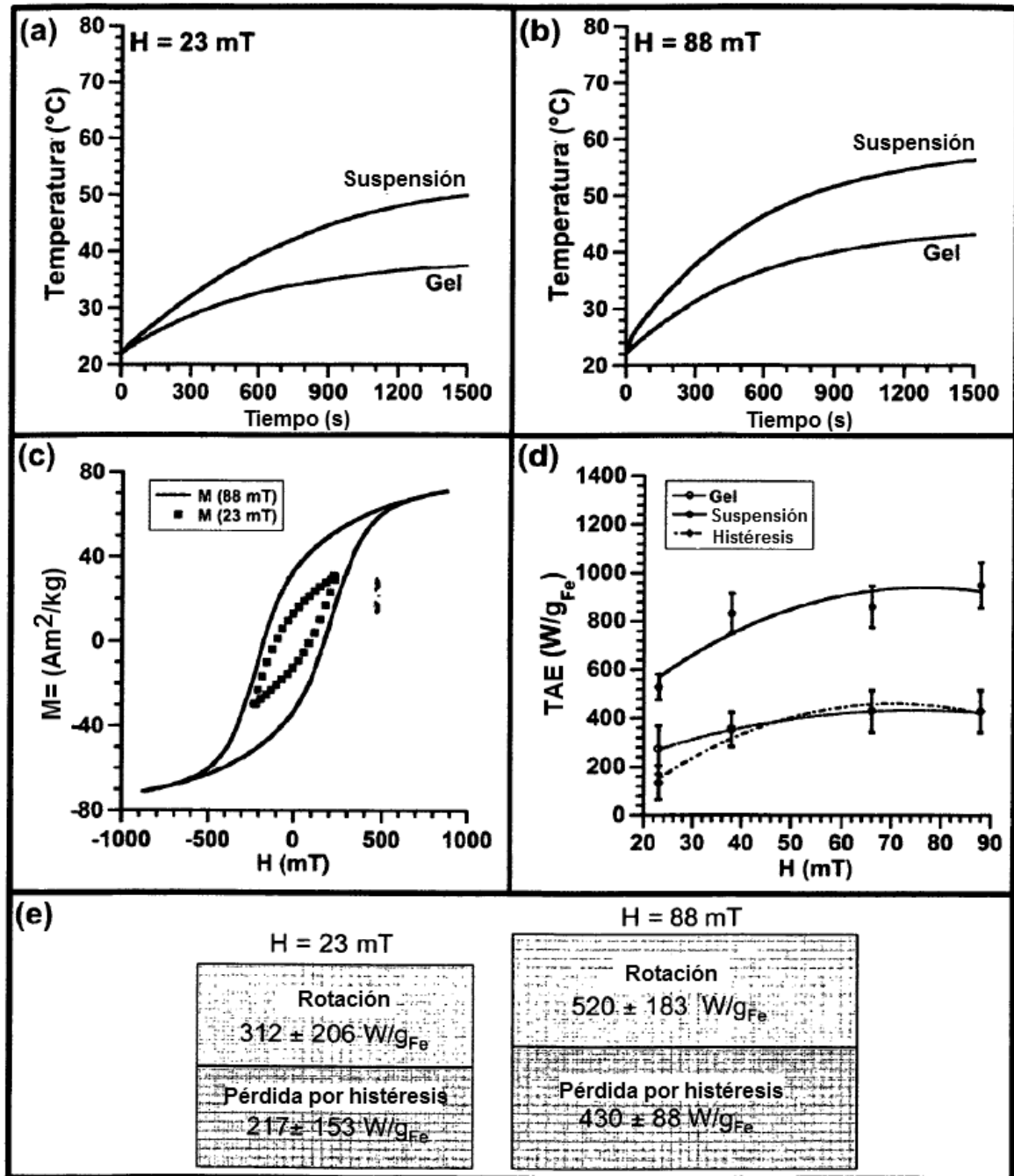


Fig. 4

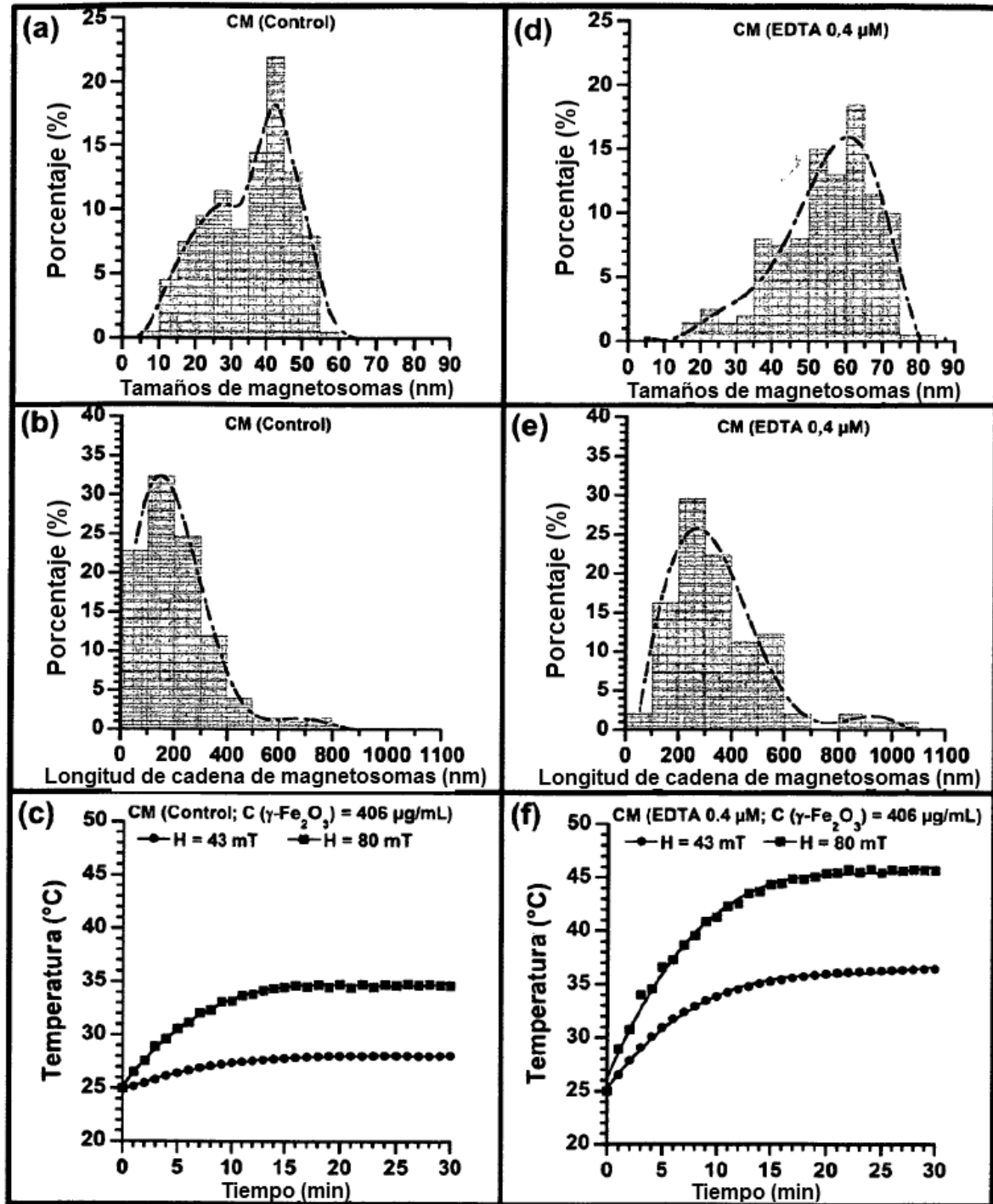


Fig. 5

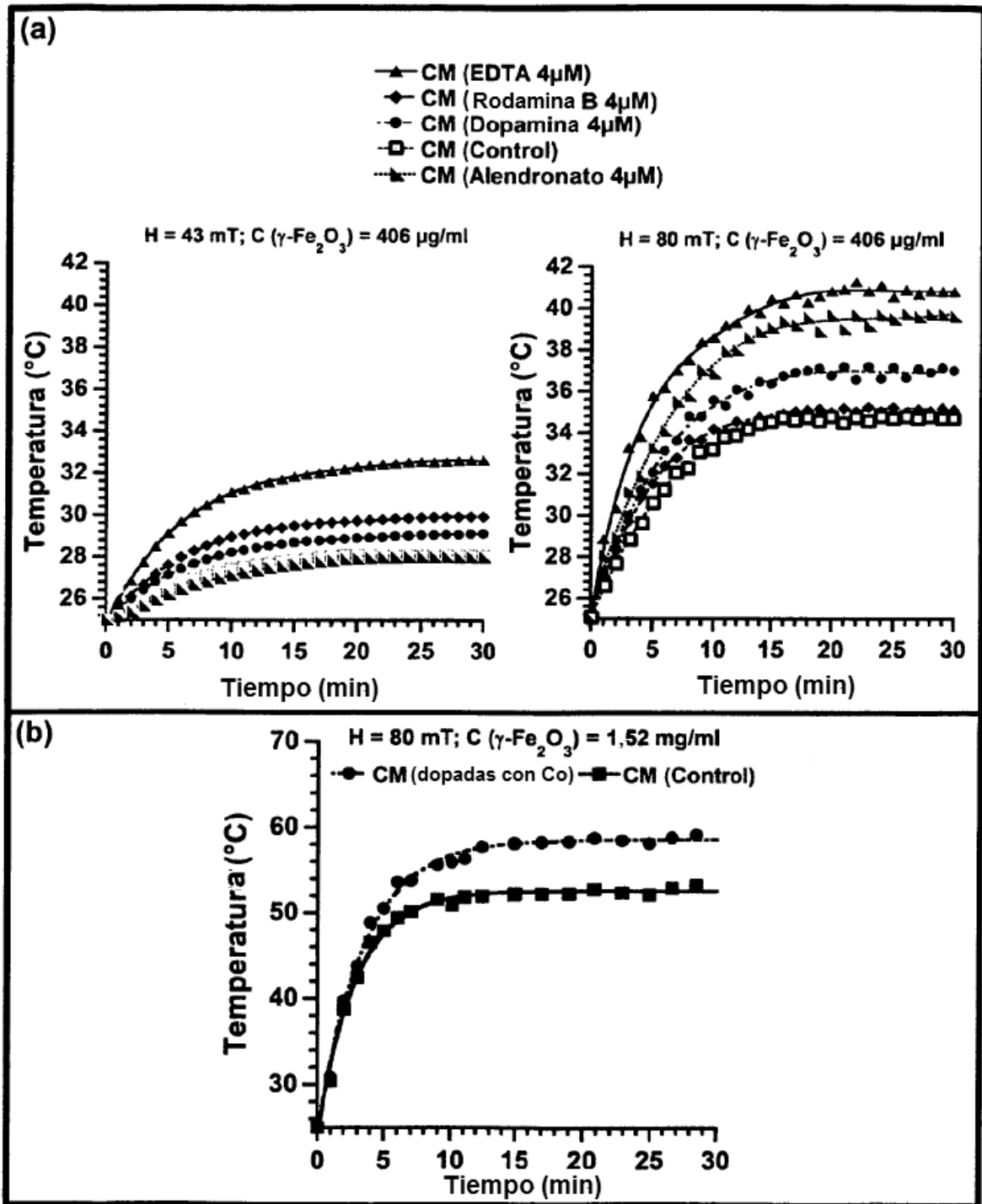


Fig. 6

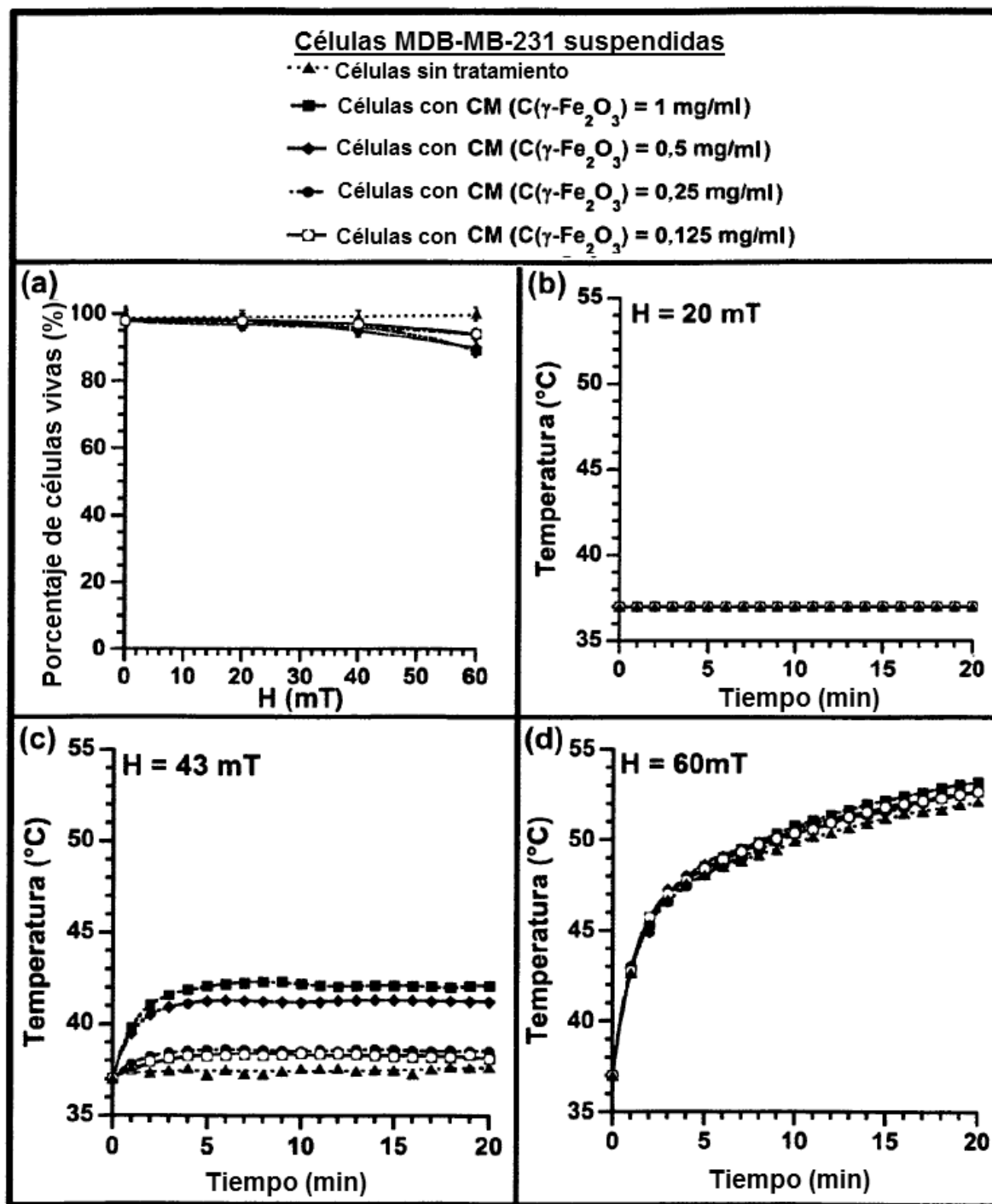


Fig. 7

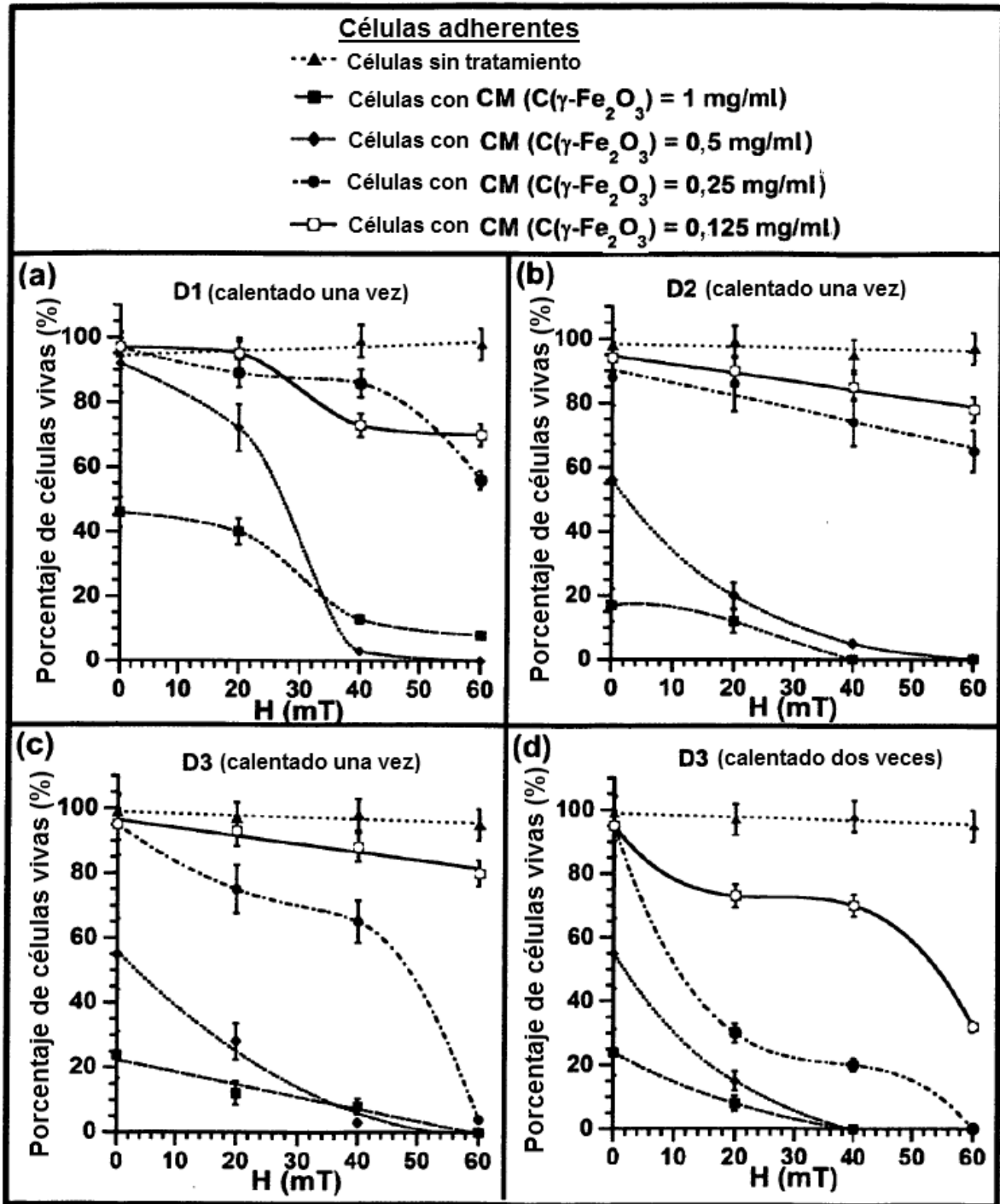


Fig. 8



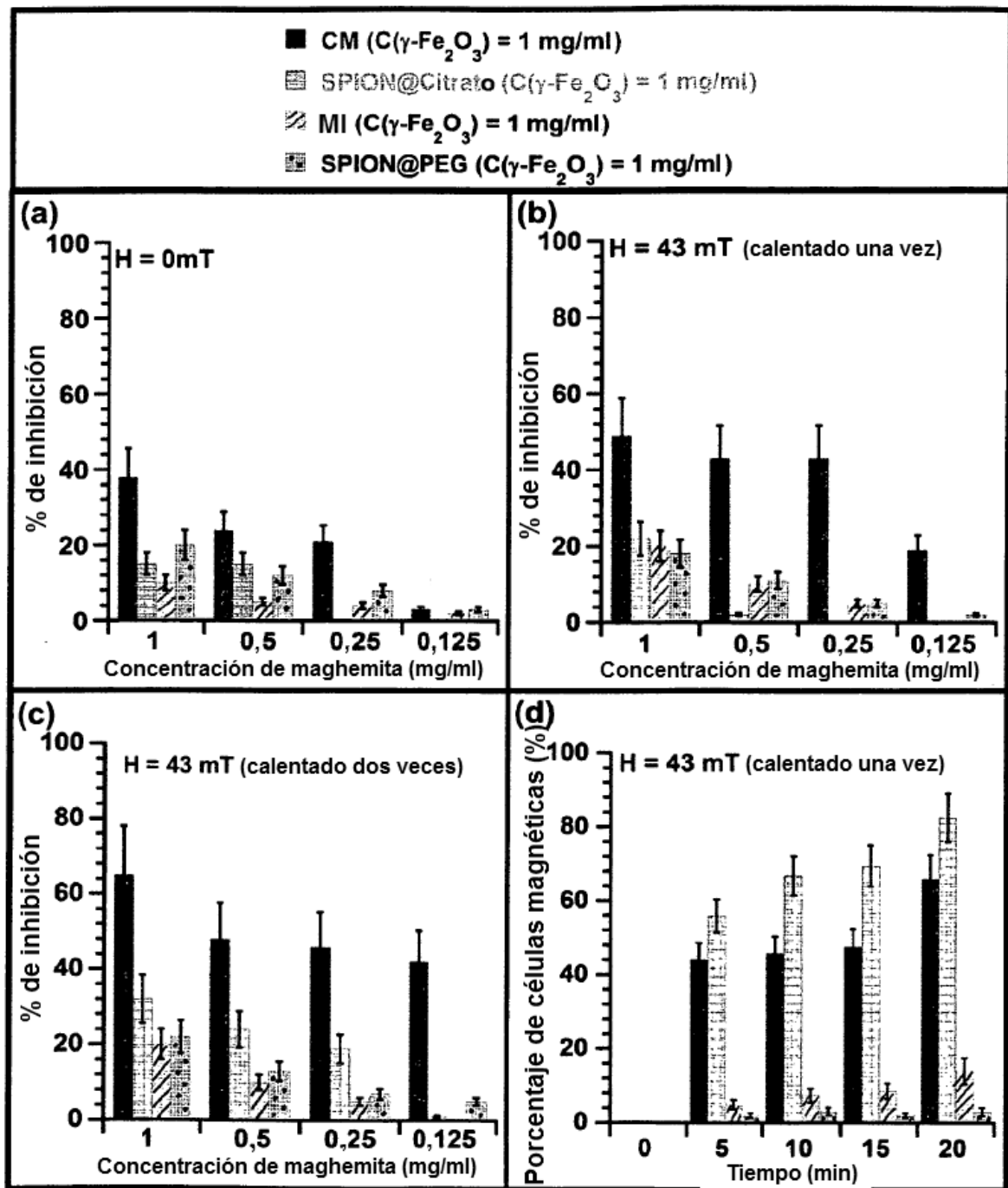


Fig. 9

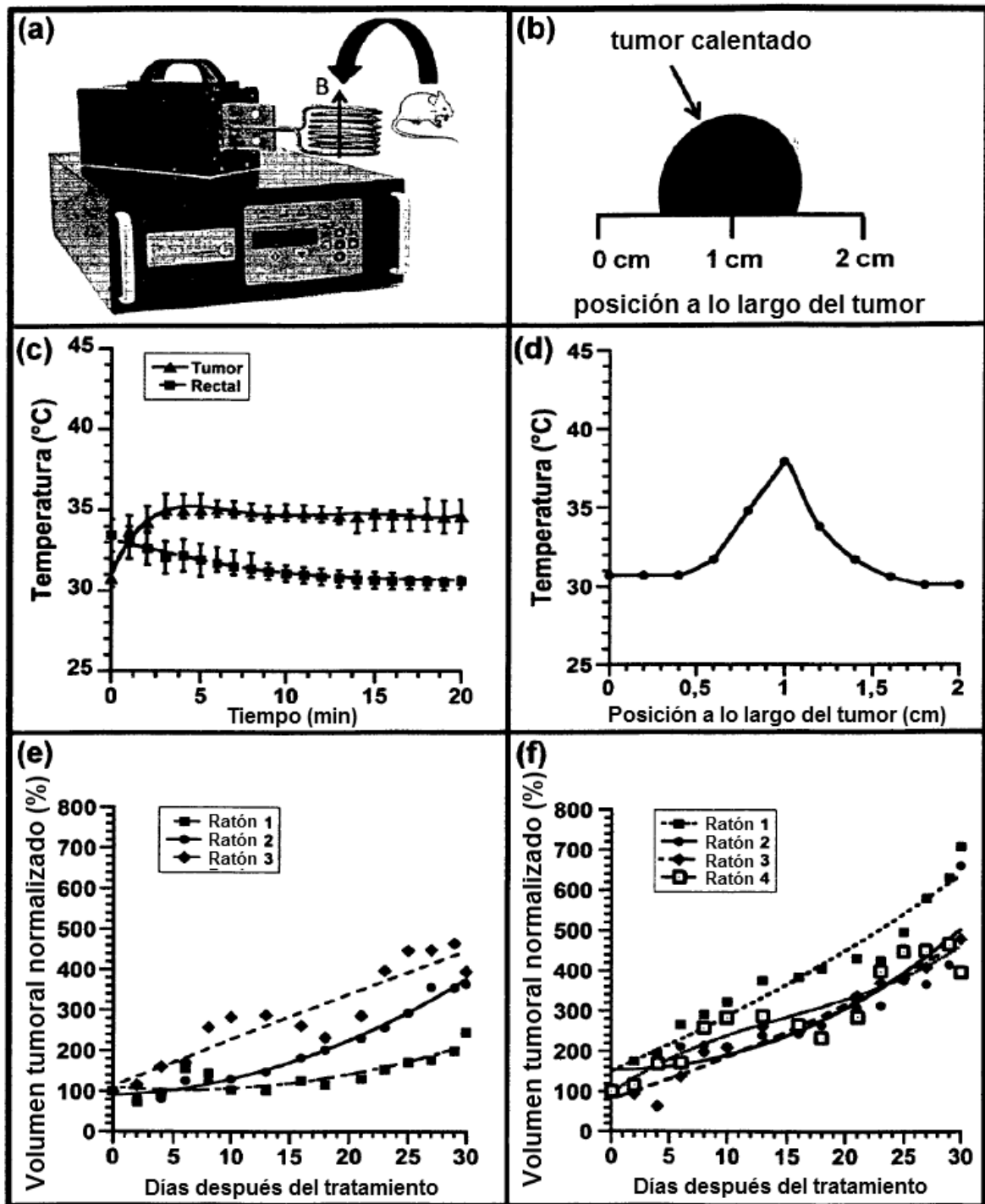


Fig. 10

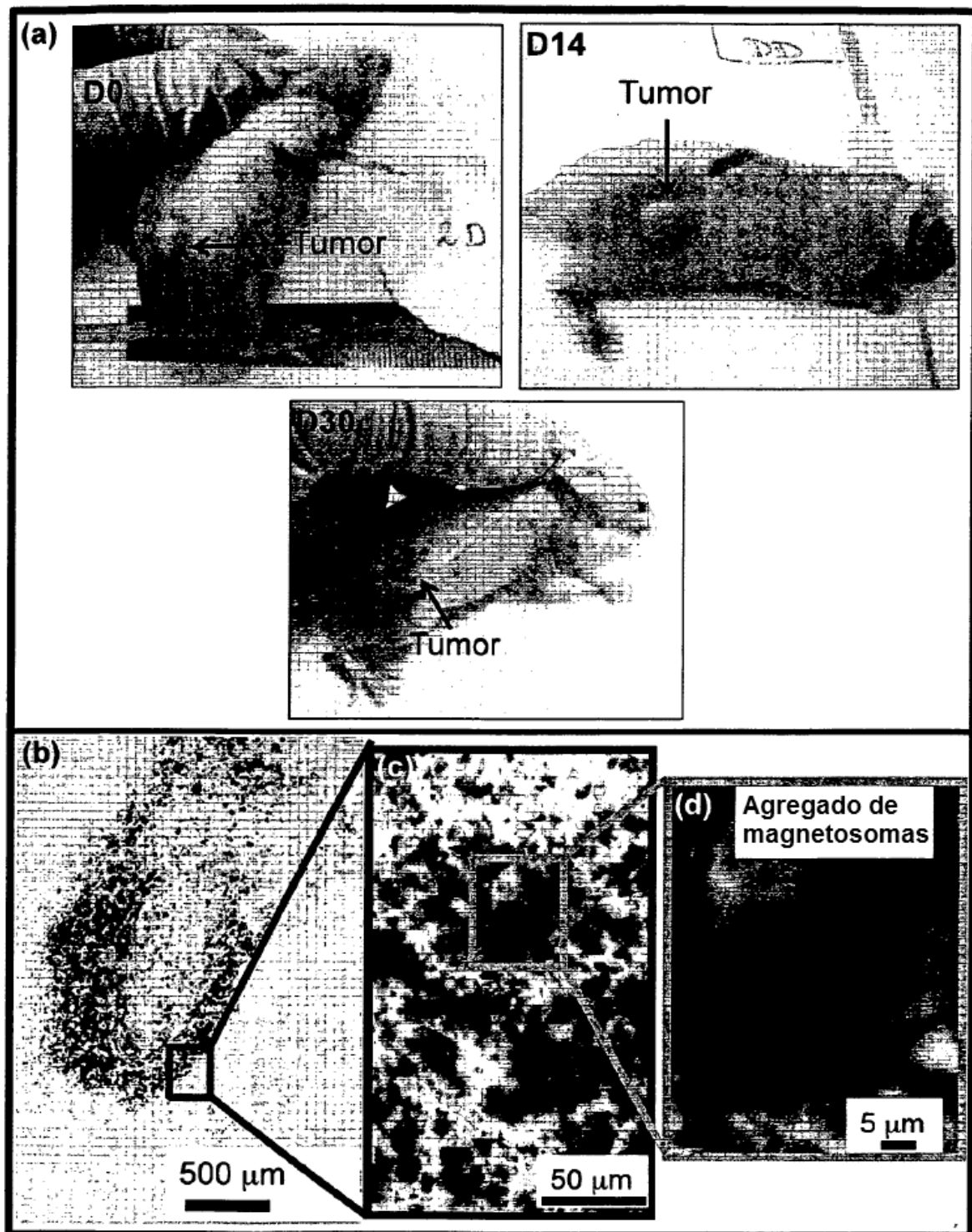


Fig. 11

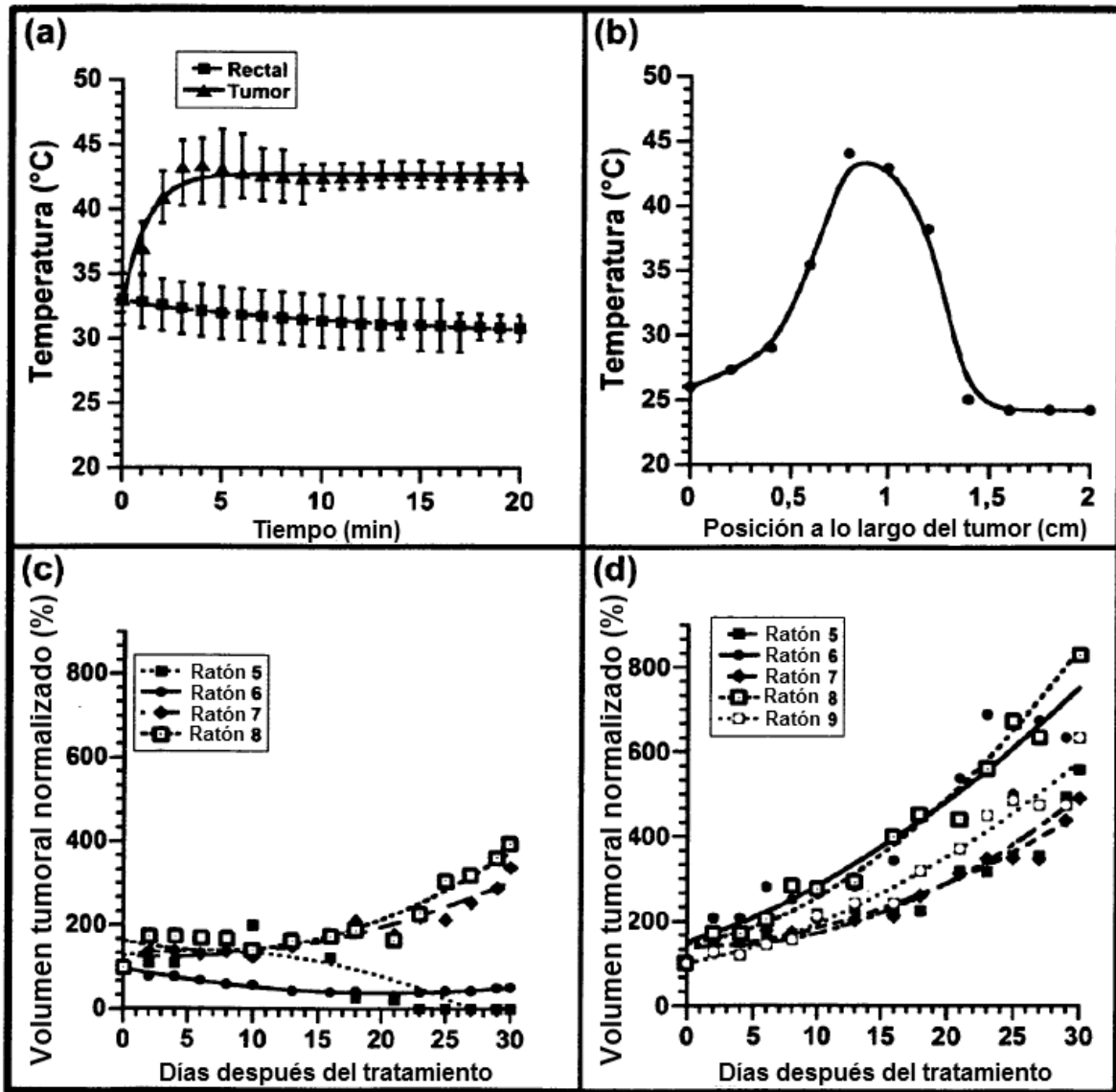


Fig. 12

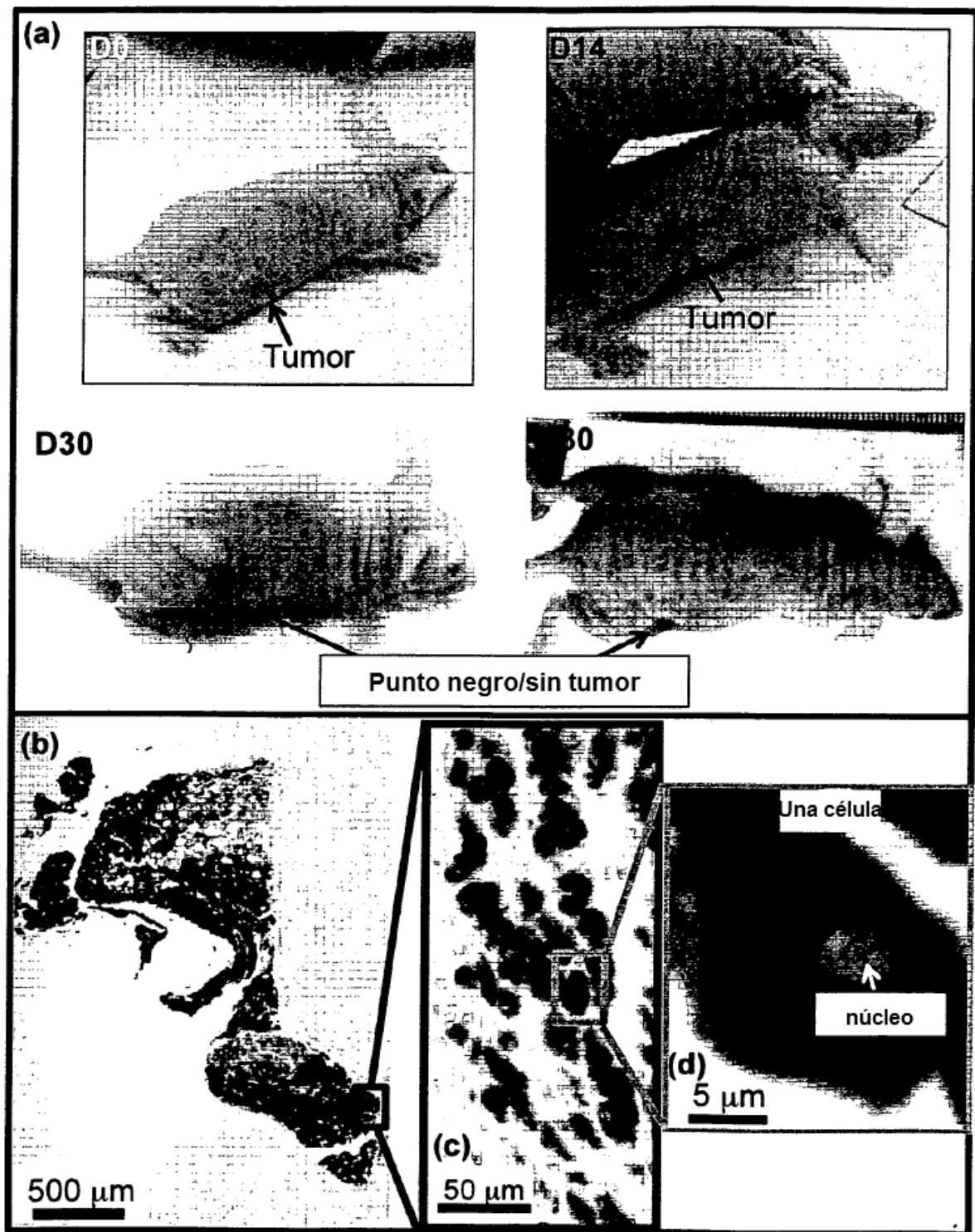


Fig. 13

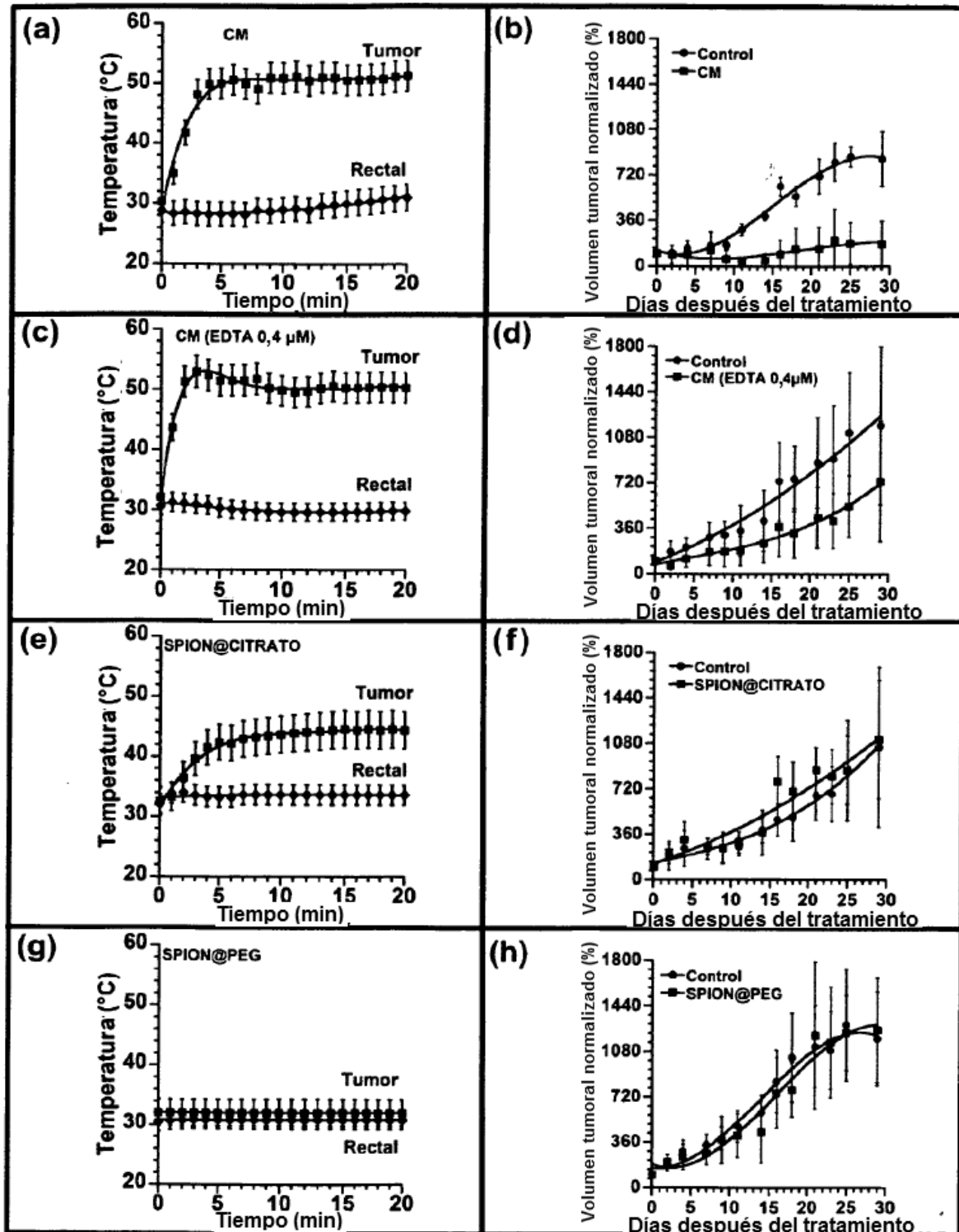


Fig. 14

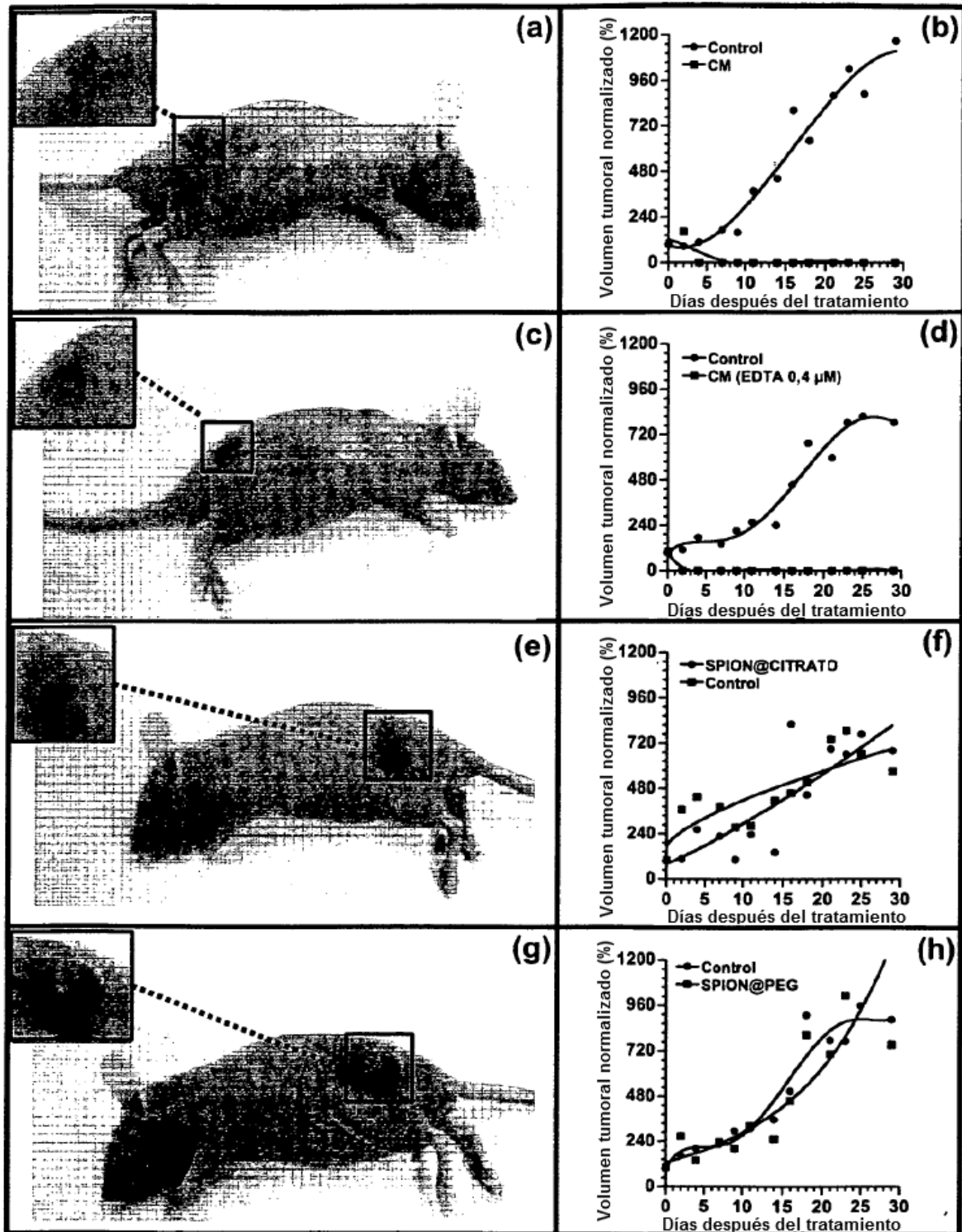


Fig. 15

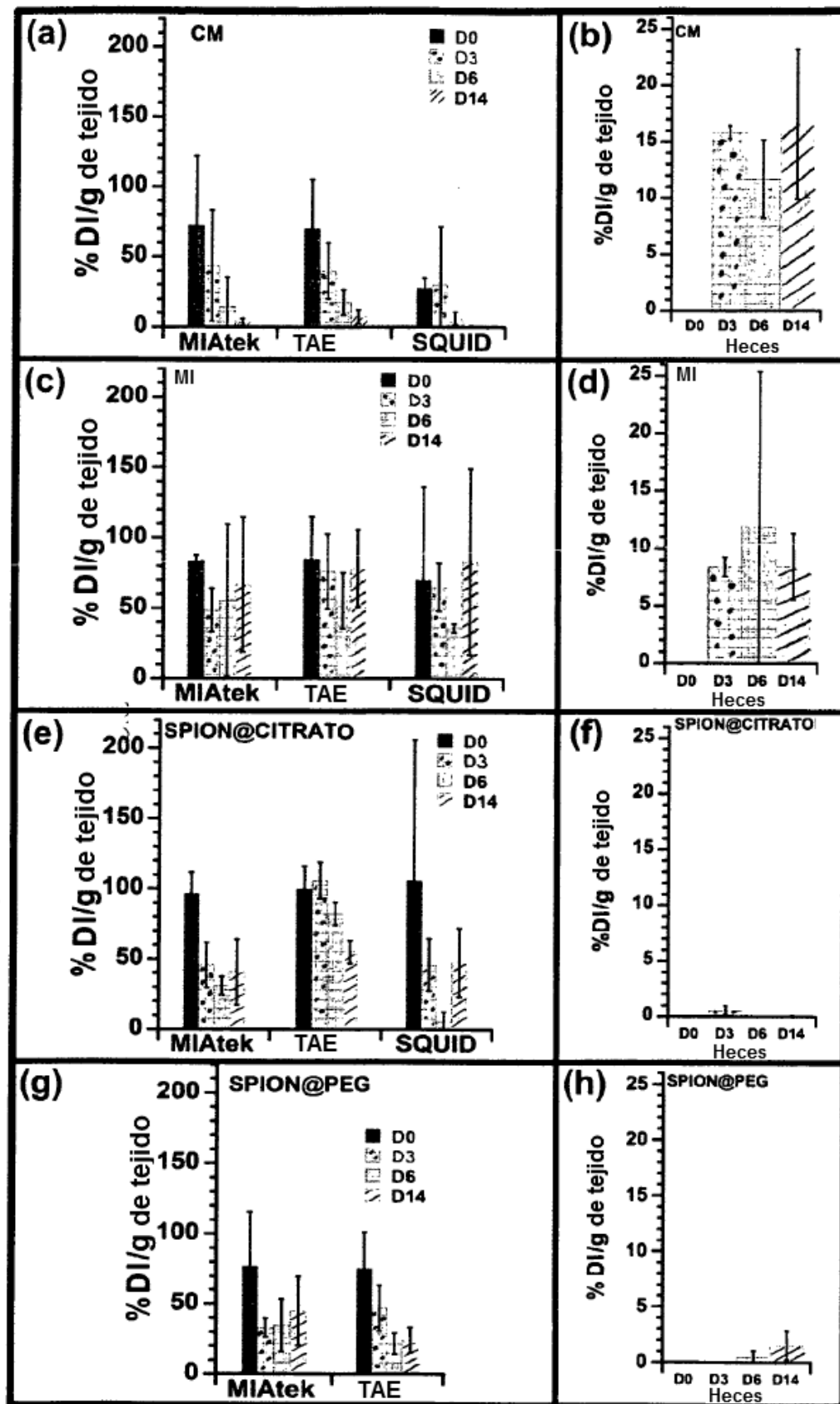


Fig. 16



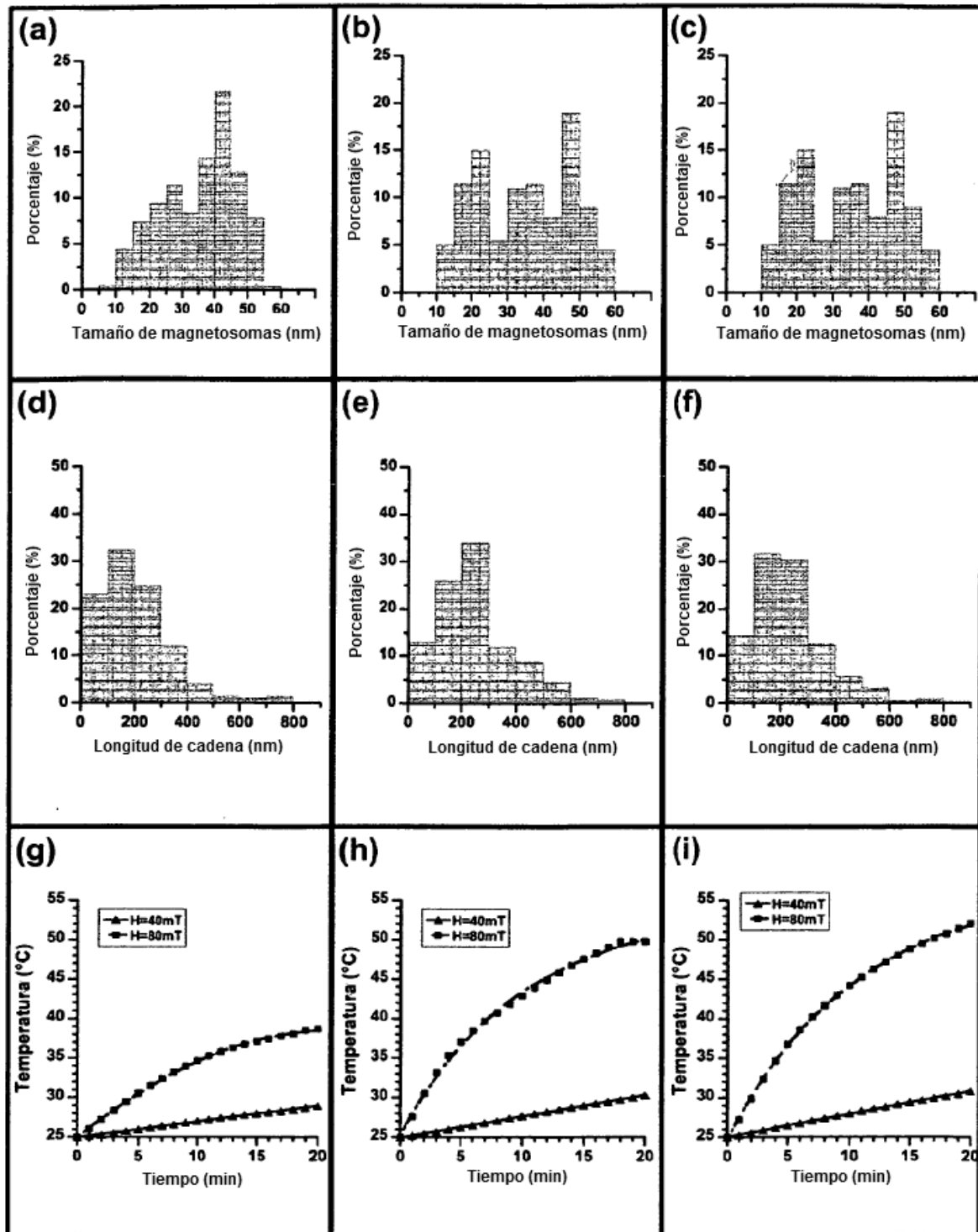


Fig.17

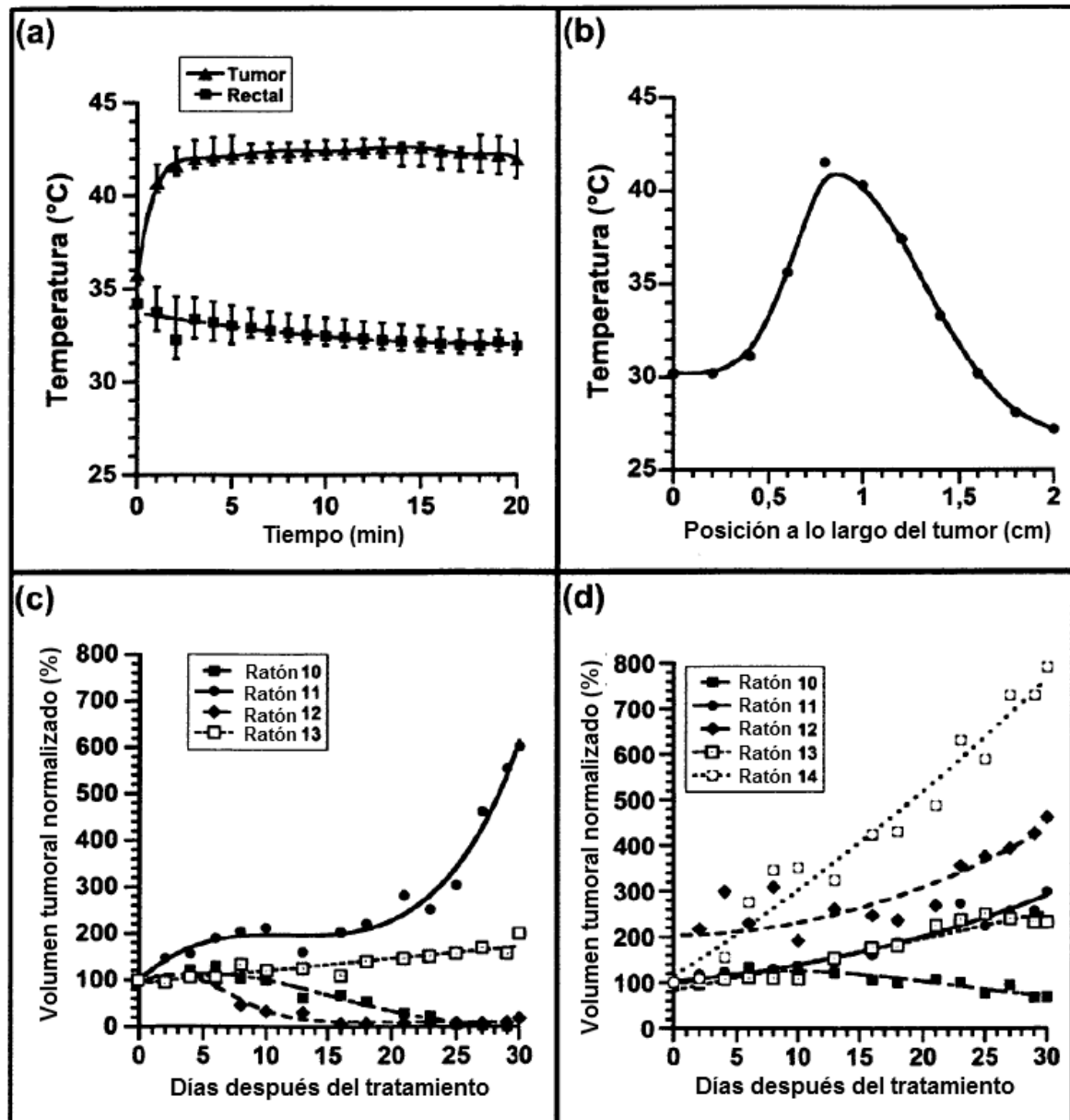


Fig. 18