

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 048**

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2009 PCT/EP2009/056880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147214**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2009 E 09757595 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2300054**

54 Título: **Nanopartículas inorgánicas de alta densidad para destruir células in vivo**

30 Prioridad:

05.06.2008 EP 08157686

10.06.2008 US 60202 P

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

17.02.2017

73 Titular/es:

NANOBIOTIX (100.0%)
60 rue de Wattignies
750012 Paris, FR

72 Inventor/es:

LEVY, LAURENT;
POTTIER, AGNÈS;
ROUET, ANNABELLE;
MARILL, JULIE;
DEVAUX, CORINNE y
GERMAIN, MATTHIEU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 048 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas inorgánicas de alta densidad para destruir células *in vivo*

Campo de la invención

5 La presente solicitud se refiere a nuevas partículas excitables que pueden ser utilizadas en el sector de la salud. Más particularmente se refiere a partículas que pueden generar electrones y/o fotones de alta energía cuando son excitadas por radiaciones ionizantes, tales como los rayos X, rayos gamma (rayos γ), isótopos radiactivos y/o haces de electrones, y a los usos de las mismas en la salud, en particular en la salud humana. Las partículas descritas en esta memoria están hechas de un material inorgánico que comprende oxígeno, en particular un óxido, teniendo dicho material una densidad adecuada, y pudiendo ser activado *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*, por excitación externa controlable, con el fin de perturbar, alterar o destruir las células, tejidos u órganos diana. La invención se refiere también a métodos para la producción de dichas partículas, y a composiciones farmacéuticas que contienen las mismas.

Antecedentes

15 Para tratar problemas relacionados con el cáncer, han sido utilizadas radiaciones de diversas formas, tales como rayos X, rayos gamma, rayos UV, luz láser, microondas, haces de electrones, así como haces de partículas de, por ejemplo, neutrones y protones. Algunas de dichas radiaciones se han utilizado en tales aplicaciones, en combinación con moléculas sensibles a la radiación. Las radiaciones electromagnéticas y ionizantes son capaces en efecto, de romper la molécula de ADN de la célula, evitando de este modo el crecimiento y división de dicha célula. Este efecto se debe principalmente a los daños creados por los electrones y/o los fotones de alta energía (energía superior a 2 keV) emitidos después de la ionización.

20 El término "radiaciones ionizantes" se refiere a partículas u ondas altamente energéticas que pueden desprender (ionizarse) al menos un electrón desde un átomo o molécula. La capacidad ionizante depende de la energía de las partículas u ondas individuales, y no de su número. Una gran corriente de partículas u ondas, no causará ionización, en las situaciones más comunes, si las partículas o las ondas individuales no son suficientemente energéticas.

25 Son ejemplos de radiaciones ionizantes las partículas energéticas, partículas beta, fotones, neutrones, electrones y partículas alfa. La capacidad de las ondas de luz (fotones) para ionizar un átomo o molécula varía a lo largo del espectro electromagnético. Los rayos X y los rayos gamma ionizarán casi cualquier molécula o átomo; la luz del ultravioleta lejano ionizará muchos átomos y moléculas; la luz del ultravioleta cercano y la luz visible son ionizantes para muy pocas moléculas; las microondas y las ondas de radio son radiaciones no ionizantes.

30 El documento WO 2005/120590 describe una partícula que comprende (i) un núcleo que comprende un primer compuesto inorgánico que absorbe los rayos X y que emite energía UV-visible, y (ii) un segundo compuesto inorgánico u orgánico, que absorbe la energía UV-visible y que produce radicales libres en contacto con el agua o el oxígeno. Las partículas activadas convierten el oxígeno circundante en radicales libres que son especies altamente reactivas que producen daños irreversibles en las células.

35 El documento US 2007/0274909 se refiere a nanopartículas para uso en la formación de imágenes o en el tratamiento por radiación de material biológico, que comprenden un material emisor de VUV o UV-C, que absorbe la radiación de alta energía y emite radiación VUV o UV-C. Los materiales emisores de VUV o UV-C descritos en esta memoria descriptiva están intencionada o no intencionadamente, pero sistemáticamente, dopados con un activador cuyo objetivo es permitir la emisión de la radiación VUV o UV-C descrita. Sin embargo, los agentes dopantes pueden estar asociados con un aumento de la toxicidad, dependiendo de su localización en la partícula o de su solubilidad en el medio de dispersión.

El documento US 6.955.639 describe un método para mejorar los efectos de la radiación de rayos X utilizando nanopartículas de metal, en particular de oro.

45 El documento WO 2008/059419 describe nanopartículas que comprenden agentes reductores no metálicos elaboradas para presentar una estructura de bandas electrónicas, para uso como sensibilizadores de radiación, comprendiendo dichos agentes reductores uno o más materiales oxídicos.

El documento WO 2008/007290 describe nanopartículas con núcleo y cubierta, en las cuales el material del núcleo tiene un salto de banda más ancho que el material de la cubierta.

50 En la presente memoria se proporcionan nuevas y potentes nanopartículas, que son más fáciles y más baratas de preparar que las descritas en la técnica, pero lo que es más importante y sorprendente, que son capaces de lograr una alteración o destrucción muy eficiente de las células diana en combinación con radiaciones ionizantes, como se demuestra en esta memoria.

Otra característica presentada por las nanopartículas descritas en la presente memoria es su capacidad para permanecer dentro del tumor durante varios días lo que permite reducir al mínimo el número de inyecciones de nanopartículas y/o agregados de nanopartículas, en el contexto de un tratamiento completo de radioterapia.

Sumario de la invención

5 Los inventores han descubierto ahora y describen en esta memoria que es posible, de manera eficiente, perturbar, alterar o destruir células, tejidos u órganos diana, en particular células o tejidos anormales, definidos aquí como células o tejidos benignos, o células o tejidos enfermos, tales como células pre-malignas o malignas (células cancerosas) o tejidos pre-malignos o malignos (tumores), posiblemente localizados profundamente en el cuerpo, a la vez que se limitan los daños a los tejidos sanos circundantes, utilizando una nanopartícula hecha de un material inorgánico que comprende oxígeno (en otras palabras, preparada con un único material inorgánico), en particular un óxido, cuya densidad es de al menos 7 g/cm³, preferiblemente por encima de 7 g/cm³, en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm³ y por debajo de 15 g/cm³.

15 La invención se refiere más particularmente al uso de nanopartículas o agregados de nanopartículas para la preparación de una composición farmacéutica para uso en un método de alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas consiste en un óxido metálico seleccionado del grupo que consiste en CeO₂, Tm₂O₃, HfO₂, WO₃ y PdO, en donde la densidad de dicha nanopartícula o la densidad de dicho agregado de nanopartículas es de al menos 7,1 g/cm³ cuando el óxido metálico es CeO₂, de al menos 8,3 g/cm³ cuando el óxido metálico es Tm₂O₃, de al menos 7,4 g/cm³ cuando el óxido metálico es HfO₂, de al menos 7,2 g/cm³ cuando el óxido metálico es WO₃, y de al menos 7,9 g/cm³ cuando el óxido metálico es PdO, y en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas está cubierto con una cubierta biocompatible que permite la estabilidad de la nanopartícula o agregado de nanopartículas a pH entre 6,5 y 7,5 en un fluido fisiológico. La invención se refiere también más particularmente a tales nanopartículas o agregados de nanopartículas, o composiciones farmacéuticas que comprenden tales nanopartículas o agregados de nanopartículas, para uso en la alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes.

Tales nanopartículas no requieren la presencia de un compuesto o material adicional distinto para generar el efecto terapéutico deseado. En particular, las nanopartículas descritas en esta memoria son capaces de convertir directamente la radiación entrante en una emisión eficiente de electrones y/o fotones de alta energía, que es responsable del subsiguiente efecto terapéutico.

30 Contrariamente a las nanopartículas descritas en los documentos WO 2005/120590 y US 2007/0274909, las presentes nanopartículas no requieren la presencia de dos compuestos distintos, uno de los cuales es necesario para convertir los rayos X en energía UV-visible. En particular, las presentes nanopartículas no comprenden un compuesto inorgánico cuyo objetivo es, como un primer compuesto, absorber los rayos X y convertirlos en energía UV-visible absorbida por un segundo compuesto que es, a su vez, responsable de los daños irreversibles en las células. Estas nanopartículas tampoco están dopadas ni diseñadas para emitir específicamente luz en la región UV.

En comparación con las nanopartículas metálicas, las presentes nanopartículas ofrecen la ventaja de presentar grupos hidroxilo (OH) en su superficie, los cuales son responsables de la compatibilidad con cualquier entorno polar, en un amplio intervalo de pH.

40 En comparación con las nanopartículas metálicas, las presentes nanopartículas, en particular las nanopartículas hechas de un óxido, ofrecen además la ventaja de ser más fáciles de preparar. Se pueden obtener suspensiones biocompatibles con una alta concentración de nanopartículas o agregados de nanopartículas con un método como se describe en esta memoria.

45 El procedimiento de síntesis no requiere el uso de un agente reductor y/o de un agente secuestrante (complejante) para evitar la agregación perjudicial de las partículas preparadas. En los métodos descritos aquí, la adición de un agente secuestrante (complejante) a las suspensiones mencionadas antes, es solamente opcional.

Por lo tanto, el procedimiento de síntesis incluye generalmente (de forma simultánea o secuencial): precipitación de un elemento químico en un medio polar, cristalización de dicho elemento químico (el oxígeno es parte de la estructura del material inorgánico) y estabilización (si fuera necesario) en un medio fisiológico.

50 Las presentes nanopartículas no requieren tampoco una molécula dirigida a concentrarse en las células o tejidos diana.

55 El efecto de permeabilidad y retención aumentada ("EPR") es verdaderamente responsable de la acumulación pasiva en la masa tumoral, al cabo de un tiempo después de la inyección por vía intravenosa (una posible vía de administración) de las nanopartículas. Se ha observado en efecto, que los vasos del tumor son bastante distintos de los capilares normales y que su "derrame" vascular favorece la extravasación selectiva de nanopartículas no habitual en los tejidos normales. La falta de drenaje linfático tumoral efectivo evita el aclaramiento de las nanopartículas penetrantes y promueve su acumulación. Las presentes nanopartículas son por lo tanto capaces de dirigirse satisfactoriamente a los tumores primarios, así como a los metastásicos después de administración intravenosa.

Las presentes nanopartículas también se pueden administrar ventajosamente por vía intratumoral, como se demuestra en la sección experimental.

5 Sin embargo, las presentes nanopartículas o agregados de nanopartículas están ventajosamente cubiertas con una cubierta biocompatible que permite la estabilidad de la nanopartícula o agregado de nanopartículas a pH entre 6,5 y 7,5 en un fluido fisiológico, como se describe adicionalmente en esta memoria más adelante.

10 Es, por lo tanto, una ventaja adicional de la presente invención proporcionar nanopartículas que no son nocivas por sí mismas, sino que se pueden emplear de forma segura, en condiciones apropiadas, para perturbar funcionalmente, alterar o destruir células diana, en particular, las células cancerosas. El efecto terapéutico deseado de las nanopartículas es en efecto, estrictamente dependiente de su excitación, siendo generada dicha excitación por la fuente de radiación ionizante, que está ella misma ventajosamente controlada, en términos de calidad y cantidad, y que se utiliza de una manera dirigida, es decir, localizada, por el experto en la técnica.

15 La presente invención describe por lo tanto una nueva clase de partículas que se pueden utilizar, si fuera apropiado de una manera dirigida, en cualquier animal, preferiblemente en un mamífero, aún más preferiblemente en un ser humano. Las partículas de la invención se pueden utilizar en cualquier tipo de tejido u órgano, superficial o profundo. En particular, la presente invención describe partículas activables que pueden inducir una alteración o destrucción de células *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, tales como, en particular, rayos X, rayos gamma, isótopos radiactivos, haces de iones y/o haces de electrones.

20 La estrategia aplicada consiste en convertir las radiaciones ionizantes entrantes principalmente en una emisión eficiente de electrones y/o de fotones de alta energía, que es responsable del efecto terapéutico. Tal resultado se obtiene utilizando las presentes nanopartículas hechas de un material inorgánico que comprende oxígeno, cuya densidad es de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 . Típicamente, la densidad de dicha nanopartícula es de al menos $7,1 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es CeO_2 , de al menos $8,3 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es Tm_2O_3 , de al menos $7,4 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es HfO_2 , de al menos $7,2 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es WO_3 , y de al menos $7,9 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es PdO .

Las presentes nanopartículas se excitan o se activan por absorción de energía de las radiaciones ionizantes. Tal absorción lleva a una cascada posterior de fenómenos que conducen a la alteración o muerte de la célula diana. Entre estos fenómenos, la emisión de electrones y/o de fotones de alta energía es predominante y crítica en el contexto de la presente invención.

30 Los inventores describen en esta memoria la eficiencia de un material inorgánico que comprende oxígeno, cuya densidad es de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 , para obtener el efecto terapéutico deseado, que consiste en la alteración o destrucción de una célula, tejido u órgano diana, tal como una célula o tejido maligno.

35 La presente descripción se refiere a productos o compuestos, aquí nanopartículas o agregados de nanopartículas, hechos de un material inorgánico que comprende oxígeno, siendo la densidad de dicho material inorgánico de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 . Se describen aquí, métodos para preparar tales compuestos.

Es un objetivo descrito en la presente memoria utilizar una nanopartícula o agregado de nanopartículas según la presente invención para alterar, destruir o eliminar una célula, tejido u órgano diana.

40 Un aspecto particular descrito aquí, se refiere al uso de una nanopartícula o agregado de nanopartículas para preparar una composición farmacéutica destinada a alterar, destruir o eliminar células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes como se describen aquí, en donde la nanopartícula está hecha de un material inorgánico que comprende oxígeno, siendo la densidad de dicho material inorgánico de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 , y al correspondiente método de tratamiento.

Los productos descritos aquí, en particular nanopartículas o agregados de nanopartículas, para uso en el tratamiento del cáncer, se divulgan en particular, en la presente memoria.

50 Otro aspecto de la descripción se basa en una composición, en particular una composición farmacéutica para uso en terapia o diagnóstico, que comprende un producto tal como se ha definido antes o que se puede obtener por el método mencionado antes. Tal composición está preferiblemente en la forma de una formulación inyectable.

55 Se da a conocer en esta memoria una composición farmacéutica, en particular, como será evidente en toda la descripción, una composición farmacéutica destinada a alterar o destruir células diana en un mamífero cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, comprendiendo dicha composición farmacéutica una nanopartícula o agregado de nanopartículas y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la nanopartícula está hecha de un material inorgánico que comprende oxígeno, siendo la densidad de dicho material inorgánico de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha

de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 , y en donde la nanopartícula o agregado de nanopartículas está cubierto preferiblemente con una cubierta biocompatible.

5 Otro aspecto de la descripción se refiere al uso de una nanopartícula o agregado de nanopartículas como se describe en la presente memoria para prevenir o tratar un cáncer o para aliviar los síntomas de un cáncer en un animal, cuando dicha nanopartícula o agregado de nanopartículas se expone a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes, como se definen aquí.

10 La presente divulgación, en particular, incluye un método para prevenir o tratar un cáncer o para aliviar los síntomas de un cáncer en un sujeto, siendo el sujeto un animal, en particular un mamífero, preferiblemente un ser humano, mediante la administración de una nanopartícula o agregado de nanopartículas como se describe en esta memoria, o de una composición que comprende dicha nanopartícula o agregado de nanopartículas, al sujeto, y exponiendo dicho sujeto a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits que comprenden uno cualquiera o más de los productos descritos en la presente memoria, es decir, nanopartículas, agregados de nanopartículas, y composiciones, junto con un prospecto que proporciona instrucciones para utilizar el producto o productos.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la distribución y dispersión a lo largo del tiempo de la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 después de inyección intratumoral en ratones suizos atímicos portadores de tumor HCT116. Se ha realizado microtomografía sobre el tumor, 2 y 15 días después de la inyección.

20 Las figuras 2A y 2B son imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 que dan una caracterización cualitativa de la forma de las nanopartículas (barra de escala = 200 nm). Se utiliza para el análisis JEOL 100 CX.

La Figura 2A muestra nanopartículas y también agregados formados con nanopartículas, que son ambos esencialmente de forma esférica.

25 La Figura 2B muestra nanopartículas preparadas de una manera diferente y agregados formados con dichas nanopartículas, que son ambos esencialmente de forma alargada.

30 La Figura 3 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas internalizadas en las células. Se trataron cultivos de HCT116 durante 24 h con suspensiones biocompatibles $5 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 y sin dichas suspensiones (control), (barra de escala 500 nm).

Las nanopartículas fueron captadas a través de los endosomas. El estudio TEM reveló claramente que las nanopartículas entran en las células a través de los endosomas de una manera que depende de la concentración. Las nanopartículas pueden entrar o penetrar en la célula, en una forma agregada o individualizada, dependiendo de su diseño y/o de su concentración.

35 Figura 4: Espectro electromagnético con radiaciones ionizantes, resaltado.

La Figura 5A muestra el nivel de gris o valor de contraste de la suspensión biocompatible de nanopartículas y agregados de nanopartículas de HfO_2 como una función de su concentración:

HfO_2 con densidad > 7: puntos de círculos

HfO_2 con densidad < 7: puntos de cruces

40 Los análisis se realizaron utilizando un microtomógrafo de rayos X (SkyScan 1076) operando con una fuente de energía de 50 KV.

45 Para una concentración dada, cuanto más alto es el nivel de gris de las nanopartículas o agregados de nanopartículas (directamente relacionado con su velocidad o capacidad de absorción), más alta es la capacidad de las nanopartículas o agregados de nanopartículas para aumentar la muerte celular inducida por la radiación, como se muestra en la figura 5B.

La Figura 5B muestra un ensayo de supervivencia clonogénico utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 biocompatibles incubadas con dos líneas de células distintas de carcinoma de colon humano a $400 \mu\text{M}$, en comparación con el control.

50 Se determina la SF_x (fracción de supervivencia bajo x grays) después de una dosis de irradiación de 2 Gy en la línea de células HCT116 radiosensibles y después de una dosis de irradiación de 4 Gy en la línea de células HT29

radiorresistentes, utilizando una fuente de irradiación de rayos X de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22 -200 kV/15 mA/0,2 mm Cu). Los valores medios se generan de 2 experimentos diferentes.

5 Figura 6: se ha inyectado intra-tumoralmente una suspensión biocompatible que comprende nanopartículas y/o agregados de nanopartículas de HfO₂, a ratones suizos atómicos portadores de tumores HCT116 (volumen de inyección entre 20 % y 50 % del volumen del tumor). Los tumores de dichos ratones se han irradiado además localmente (2 sesiones, identificadas aquí también como 2 fracciones, de 4 Gy; puntos de círculos) con un aplicador acoplado a una fuente de irradiación utilizada de un modo externo [dispositivo de curieterapia con fuente de iridio-192]

10 La misma suspensión biocompatible ha sido administrada a un grupo control de ratones (volumen de inyección entre 20 % y 50 % del volumen del tumor). Dicho grupo control no fue irradiado (puntos de cruces).

Los grupos de ratones descritos anteriormente se comparan con los ratones tratados con el vehículo sometidos a radioterapia (puntos de triángulos) o no sometidos a radioterapia (puntos de rombos). El volumen del tumor se vigila en cada grupo dos veces por semana durante 25 días después de la irradiación.

15 La Figura 7 muestra imágenes de ratones portadores de células tumorales HCT116, 21 días después de la irradiación:

Figura 7A: ratones tratados con irradiación después de la inyección intratumoral de un vehículo (sin partículas)

Figura 7B: ratones tratados con irradiación después de la inyección intratumoral de nanopartículas

20 La Figura 8 muestra ensayos de supervivencia clonogénicos utilizando células cancerosas HCT116 (modelo radiosensible) y HT29 (modelo radiorresistente) irradiadas utilizando un generador de rayos X de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22 -200 kV/15 mA/0,2 mm Cu), en ausencia (control negativo) o en presencia de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ a 400 µM. La dosis de irradiación varía de 0 a 4 Gy.

Control negativo con HCT116: puntos de cruces

Nanopartículas con HCT116: puntos de cuadrados

Control negativo con HT29: puntos de rombos

25 Nanopartículas con HT29: puntos de círculos

La Figura 9 muestra la evolución de los volúmenes de tumor HCT116 después de inyección intratumoral de una suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂, seguida por una irradiación del tumor de 2 x 4 Gy o de 1 x 8 Gy con un aplicador acoplado a una irradiación externa utilizando el dispositivo de curieterapia con fuente de iridio-192.

30 Se calculan los valores medios de 8 ratones suizos atómicos.

Grupo control con vehículo inyectado (sin irradiación, sin nanopartículas): puntos de rombos.

Grupo con nanopartículas inyectadas (sin irradiación): puntos de cruces

Grupo con vehículos inyectados y sometido a una irradiación de 1 x 8 Gy (sin nanopartículas): puntos de cuadrados

Grupo con vehículos inyectados y sometido a una irradiación de 2 x 4 Gy (sin nanopartículas): puntos de triángulos

35 Grupo con nanopartículas inyectadas y sometido a una irradiación de 1 x 8 Gy: puntos de círculos abiertos

Grupo con nanopartículas inyectadas y sometido a una irradiación de 2 x 4 Gy: puntos de círculos

La Figura 10 muestra la viabilidad celular medida después de un período de tratamiento de 24 horas con o sin nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ (concentración 800 µM). Las dosis de irradiación varían de 0 a 6 Gy. Se utiliza el kit WST1 para leer la viabilidad. Cada punto es el valor medio de 3 experimentos.

40 Con nanopartículas e irradiación: puntos de triángulos

Sin nanopartículas y con irradiación: puntos de cuadrados

45 La Figura 11A muestra ensayos de supervivencia clonogénicos que utilizan células cancerosas HT1080 (modelo de fibrosarcoma radiorresistente) irradiadas utilizando un generador de rayos X de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22 -200 kV/15 mA/0,2 mm Cu), en ausencia (control negativo) o en presencia de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ a 400 µM. La dosis de irradiación varía de 0 a 4 Gy.

Control negativo con HT1080: puntos de cruces

Nanopartículas con HT1080: puntos de cuadrados

La Figura 11B muestra ensayos clonogénicos que utilizan células cancerosas HT1080 (modelo de fibrosarcoma radorresistente) irradiadas utilizando una fuente de cobalto 60, en ausencia (control negativo) o en presencia de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 a 400 μM . La dosis de irradiación varía de 0 a 4 Gy.

5 Control negativo con HT1080: puntos de cruces

Nanopartículas con HT1080: puntos de cuadrados

Se realizaron ensayos clonogénicos similares sobre “células de fibroblastos humanos” (células no cancerosas) como un control, utilizando nanopartículas, y no demostraron ningún efecto o un efecto muy moderado. Los resultados obtenidos cuando se compara la reacción respectiva de las células cancerosas y las células normales bajo irradiación, revelan una alta relación beneficio-riesgo.

10 La Figura 12A muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 (400 μM) con densidad de 7,4 g/cm^3 (ejemplo 10 a)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

15 Con nanopartículas (HfO_2 -L d = 7,4) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -L d = 7,4) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12B muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 (400 μM) con densidad de 6,8 g/cm^3 (ejemplo 10 a)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

20 Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (HfO_2 -E d = 6,8) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -E d = 6,8) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12C muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 (400 μM) con densidad de 6,7 g/cm^3 (ejemplo 10 a)).

25 Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (HfO_2 -V d = 6,7) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -V d = 6,7) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

30 La Figura 12D muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de CeO_2 (400 μM) con densidad de 7,1 g/cm^3 (ejemplo 10 b))

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (CeO_2 -W d = 7,1) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (CeO_2 -W d = 7,1) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

35 La Figura 12E muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de CeO_2 (400 μM) con densidad de 6,5 g/cm^3 (ejemplo 10 b))

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (CeO_2 -S d = 6,5) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

40 Con nanopartículas (CeO_2 -S d = 6,5) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

ES 2 602 048 T3

La Figura 12F muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de TiO_2 (400 μM) con densidad de 3,9 g/cm^3 (ejemplo 10 d)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

5 Con nanopartículas (TiO_2 -5 nm d = 3,9) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (TiO_2 -5 nm d = 3,9) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12G muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de PdO (400 μM) con densidad de 7,9 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

10 Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (PdO -A d = 7,9) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (PdO -A d = 7,9) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12H muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de TiO_2 (400 μM) con densidad de 3,8 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

15 Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (TiO_2 -P25 d = 3,8) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (TiO_2 -P25 d = 3,8) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

20 La Figura 12I muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de CeO_2 (400 μM) con densidad de 6,6 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (CeO_2 -D d = 6,6) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (CeO_2 -D d = 6,6) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

25 La Figura 12J muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de Nd_2O_3 (400 μM) con densidad de 5,4 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas (Nd_2O_3 -Z d = 5,4) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

30 Con nanopartículas (Nd_2O_3 -Z d = 5,4) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12K muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de Eu_2O_3 (400 μM) con densidad de 5,6 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

35 Con nanopartículas (Eu_2O_3 -B d = 5,6) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas (Eu_2O_3 -B d = 5,6) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

La Figura 12L muestra la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas de WO_3 (400 μM) con densidad de 7,2 g/cm^3 (ejemplo 10 e)).

Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y sin irradiación: puntos de cuadrados llenos

40 Con nanopartículas (HfO_2 -Ref. /ejemplo 3 / d = 8,3) y con irradiación: puntos de rombos abiertos

Con nanopartículas ($\text{WO}_3\text{-C}$ $d = 7,2$) y sin irradiación: puntos de triángulos llenos

Con nanopartículas ($\text{WO}_3\text{-C}$ $d = 7,2$) y con irradiación: puntos de círculos abiertos

5 La Figura 13 muestra la eficiencia relativa (capacidad para inducir la muerte celular) expresada como porcentaje. Dicha eficiencia relativa refleja la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy de las partículas ensayadas en el ejemplo 10, a 800 μM , cuando se compara con el tratamiento radioterapéutico solo (sin nanopartículas), con respecto a la viabilidad celular (% de control) de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 biocompatibles (véase el ejemplo 3), a 800 μM , cuando se compara con el tratamiento radioterapéutico solo (sin nanopartículas).

Se distinguen dos grupos de nanopartículas con diferencias importantes en términos de eficiencia:

- 10 – densidad $< 7 \text{ g/cm}^3$: la eficiencia relativa de las nanopartículas ensayadas es inferior a aproximadamente el 55 %
- densidad $\geq 7 \text{ g/cm}^3$: la eficiencia relativa de las nanopartículas ensayadas es superior a aproximadamente el 80 %

15 La Figura 14 revela la estabilidad o falta de estabilidad de las nanopartículas (véase $\text{CeO}_2\text{-D}$ del ejemplo 10 e), $\text{TiO}_2\text{-5 nm}$ del ejemplo 10d) y HfO_2 del ejemplo 3) a concentración de aproximadamente 5 g/L, comprendiendo o no una cubierta biocompatible de HMP, en diferentes condiciones: se incubaron las muestras durante 2 horas en agua o en una solución de glucosa al 5 % a pH 3 o pH 7 (véase el ejemplo 11).

20 La Figura 15 muestra los resultados de los ensayos de filtración por 0,22 μm (véase el ejemplo 11): las diferentes muestras ($\text{CeO}_2\text{-D}$ del ejemplo 10 e), $\text{TiO}_2\text{-5 nm}$ del ejemplo 10d) y HfO_2 del ejemplo 3) contienen o no una cubierta biocompatible de HMP (incubadas durante 2 horas en agua o en una solución de glucosa al 5 % a pH 7). Las concentraciones se expresan en g/L y el rendimiento de la filtración en %.

Descripción detallada de la invención

25 Ha sido encontrado sorprendentemente, por los inventores, que una nanopartícula hecha de un material inorgánico que comprende oxígeno, preferiblemente un material inorgánico cristalizado que comprende oxígeno, aún más preferiblemente un óxido, siendo la densidad de dicho material inorgánico de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 , puede mejorar el efecto terapéutico de una irradiación local destinada a perturbar, alterar o destruir las células, tejidos u órganos anormales en un animal. Típicamente, la densidad de la nanopartícula es de al menos 7,1 g/cm^3 cuando el óxido metálico es CeO_2 , de al menos 8,3 g/cm^3 cuando el óxido metálico es Tm_2O_3 , de al menos 7,4 g/cm^3 cuando el óxido metálico es HfO_2 , de al menos 7,2 g/cm^3 cuando el óxido metálico es WO_3 , y de al menos 7,9 g/cm^3 cuando el óxido metálico es PdO .

Se puede observar por primera vez un fuerte aumento de la eficacia de la radioterapia *in vitro* utilizando nanopartículas según la presente invención (véase las figuras 5B, 8, 10, 11A y 11B, por ejemplo).

35 Los inventores proporcionan en la presente memoria la prueba de que los tumores en animales se reducen de tamaño y eventualmente desaparecen (remisión completa) después de la inyección de las nanopartículas descritas aquí, cuando dichos animales se exponen localmente a una irradiación de dosis baja capaz de activar dichas nanopartículas (véase la parte experimental y las figuras 6, 7 y 9).

40 El término "nanopartícula" o "agregado de nanopartículas" se refiere a productos sintéticos de pequeño tamaño. Su forma puede ser, por ejemplo, redonda, plana, alargada, esférica u oval. La forma se puede determinar o controlar por el método de producción, y puede ser adaptada por los expertos en la técnica según las aplicaciones deseadas.

45 La forma de las partículas no tiene una gran influencia sobre sus propiedades. Sin embargo, la forma puede influir en la "biocompatibilidad" de las partículas. Por lo tanto, por razones farmacocinéticas, se prefieren nanopartículas o agregados de nanopartículas que sean esencialmente de forma alargada, esférica o redonda. Se prefiere particularmente la forma esférica o redonda. También, se prefieren partículas o agregados de nanopartículas que tengan una forma bastante homogénea.

De una manera preferida, el tamaño de las partículas o agregados de nanopartículas según la invención está comprendido, típicamente, entre aproximadamente 3 nm y 400 nm, preferiblemente entre aproximadamente 5, 10, 15 o 20 nm y 200 nm, aún más preferiblemente entre aproximadamente 20 y 100 nm o aproximadamente 40 nm y 100 nm.

50 En realidad, el tamaño de los objetos debe ser idealmente suficientemente pequeño para que puedan difundirse en el cuerpo (tejidos, células, vasos sanguíneos, etc.), esencialmente sin ser capturados por los macrófagos (fagocitosis) y sin causar una obstrucción significativa. Ventajosamente, estos efectos se pueden obtener en los seres humanos con partículas que tienen un tamaño medio de partícula inferior a 100 nm.

La agregación puede llevar a la fusión de las nanopartículas individuales dentro de la estructura de agregado.

Se prefieren las nanopartículas que tienen un área superficial específica baja, con el fin de limitar sus interacciones con el entorno circundante. Para el propósito de la presente invención, el área superficial específica de la nanopartícula está comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 10 m²/g y 80 m²/g. El área superficial específica está comprendida preferiblemente entre 20 y 60 m²/g.

La sorprendente eficiencia de las nanopartículas descritas en la presente memoria, se debe principalmente a la naturaleza de su material constitutivo que es un material inorgánico que comprende oxígeno, preferiblemente un material cristalizado, cuya densidad es de al menos 7 g/cm³, preferiblemente por encima de 7 g/cm³, en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm³ y por debajo de 15 g/cm³, en particular entre 8 y 14 g/cm³, u 8 y 12 g/cm³. Típicamente, la densidad de la nanopartícula es de al menos 7,1 g/cm³ cuando el óxido metálico es CeO₂, de al menos 8,3 g/cm³ cuando el óxido metálico es Tm₂O₃, de al menos 7,4 g/cm³ cuando el óxido metálico es HfO₂, de al menos 7,2 g/cm³ cuando el óxido metálico es WO₃, y de al menos 7,9 g/cm³ cuando el óxido metálico es PdO. Una nanopartícula de este tipo es, en efecto, capaz de absorber radiaciones ionizantes y de emitir una cantidad suficiente de electrones y/o fotones de alta energía, en particular cuando se utilizan radiaciones ionizantes de baja intensidad, para que sean directamente responsables de la alteración o destrucción de una célula, tejido u órgano diana. Se debe observar que la presente invención se puede utilizar también ventajosamente con radiaciones ionizantes de alta intensidad (véase la figura 11B)

Las dosis de radiaciones ionizantes son preferiblemente dosis comprendidas entre aproximadamente 0,05 grays y 6 grays para aplicaciones realizadas *in vitro*.

Las dosis están comprendidas entre más de 0,05 grays y menos de 16 o 30 grays para aplicaciones realizadas *ex vivo* o *in vivo*. Las radiaciones ionizantes totales varían de 1,5 grays hasta aproximadamente 85 grays en el ser humano según la práctica actual.

La dosis total de radiaciones administrada se puede dar siguiendo diferentes programas tales como de dosis única, dosis fraccionada, dosis hiperfraccionada, etc.

Las nanopartículas irradiadas descritas en esta memoria, proporcionan, como se demuestra en la sección experimental, una clara mejora del efecto terapéutico en comparación con la radioterapia estándar.

El material inorgánico mencionado antes es preferiblemente un material inorgánico. En la presente invención, el material inorgánico es un óxido como se indica en las reivindicaciones. Un óxido es un compuesto químico que contiene al menos un átomo de oxígeno y al menos un segundo elemento químico distinto. Dicho elemento químico distinto se puede utilizar como un precursor en los métodos descritos aquí para preparar una nanopartícula o agregado de nanopartículas. En el contexto de la presente invención, un óxido preferido es un óxido metálico (M_xO_y) (véase "Metal Oxide Chemistry and Synthesis – from solution to solid state", Jean-Pierre Jolivet, Savoirs Actuels InterEditions/ CNRS, Editions 1994) y un tungstato (M_x(WO₄)_y).

El óxido metálico de interés descrito en la presente memoria, se puede seleccionar del grupo que consiste en un óxido de un elemento lantánido y un óxido de un elemento químico (metálico) de la tabla periódica de los elementos (tabla de Mendeleev), en particular un óxido de un elemento metálico de los periodos 5 y 6 de la tabla periódica.

Se indican a continuación, ejemplos de elementos, descritos en la presente memoria, que pueden ser utilizados:

- los óxidos apropiados de un elemento lantánido se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en CeO₂, Nd₂O₃, Sm₂O₃, Eu₂O₃, Gd₂O₃, Tb₂O₃, Dy₂O₃, Ho₂O₃, Er₂O₃, Tm₂O₃, Yb₂O₃, Lu₂O₃ y mezclas de los mismos;
- los óxidos apropiados de un elemento metálico del período 6 de la tabla periódica de los elementos se pueden seleccionar por ejemplo del grupo que consiste en HfO₂, Ta₂O₅, WO₂, WO₃, ReO₂, OsO₂, IrO₂, PtO, PtO₂, HgO, Hg₂O, Tl₂O₃, PbO, Pb₂O₃, Pb₃O₄, PbO₂, PoO₂, Bi₂O₃ y mezclas de los mismos;
- los óxidos apropiados de un elemento metálico del período 5 de la tabla periódica de los elementos se pueden seleccionar por ejemplo del grupo que consiste en NbO, RuO₂, Rh₂O₃, RhO₂, PdO, Ag₂O, AgO, CdO, In₂O₃, y mezclas de los mismos.

El tungstato (M_x(WO₄)_y) se describe también en esta memoria como un material inorgánico que comprende oxígeno.

Los tungstatos preferidos se pueden seleccionar del grupo que consiste, por ejemplo, en FeWO₄, CuWO₄, MnWO₄, PbWO₄ y mezclas de los mismos.

También es posible la mezcla de óxidos y tungstatos en una nanopartícula particular.

Como se ha indicado previamente, se describen aquí nanopartículas de interés que tienen que ser hechas de un material inorgánico que comprende oxígeno, siendo la densidad de dicho material inorgánico de al menos 7 g/cm³,

preferiblemente por encima de 7 g/cm³, en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm³ y por debajo de 15 g/cm³, en particular entre 8 y 14 g/cm³, u 8 y 12 g/cm³.

La densidad es masa *m* por unidad de volumen *V*. En el contexto de la presente invención, se obtiene una mejor eficacia terapéutica utilizando nanopartículas que tienen una densidad alta.

- 5 El umbral de densidad requerido para conseguir tal mejora de la eficacia terapéutica ha sido descrito aquí por los inventores, como de 7 g/cm³. Se debe entender que se prefieren las densidades más altas. Las densidades descritas son de al menos 7,5 g/cm³, preferiblemente de al menos 8 g/cm³, incluso más preferiblemente de al menos 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5 o 14 g/cm³.

- 10 La densidad de las nanopartículas o agregados de nanopartículas se determina a partir de aproximadamente 1 g de polvo seco utilizando un equipo de picnómetro Accupyc 1340.

Las nanopartículas descritas en esta memoria se hacen preferiblemente de un material inorgánico que tiene un número atómico efectivo (*Z_{eff}*) de al menos 50, preferiblemente al menos 60 o 61, más preferiblemente de al menos 65, 66, 67 o incluso 68.

- 15 Número atómico efectivo es un término que es similar al número atómico pero que se utiliza para compuestos (por ejemplo, agua) y mezclas de diferentes materiales (tales como tejidos y huesos) más que para átomos. El número atómico efectivo calcula el número atómico medio para un compuesto o mezcla de materiales. Se abrevia como *Z_{eff}*.

El número atómico efectivo se calcula tomando la proporción fraccionaria de cada átomo en el compuesto y multiplicándola por el número atómico del átomo. La fórmula para el número atómico efectivo, *Z_{eff}*, es la siguiente:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{f_1 \times (Z_1)^{2.94} + f_2 \times (Z_2)^{2.94} + f_3 \times (Z_3)^{2.94} + \dots}$$

- 20 donde

f_n es la fracción del número total de electrones asociados con cada elemento, y *Z_n* es el número atómico de cada elemento.

- 25 El número atómico (conocido también como el número de protones) es el número de protones que se encuentra en el núcleo de un átomo. Se representa tradicionalmente por el símbolo *Z*. El número atómico identifica de forma única un elemento químico. En un átomo de carga neutra, el número atómico es igual al número de electrones.

Un ejemplo es el del agua (H₂O) que se compone de dos átomos de hidrógeno (*Z* = 1) y un átomo de oxígeno (*Z* = 8). El número total de electrones es 1 + 1 + 8 = 10. La fracción de electrones correspondientes a los dos hidrógenos es 2/10 y la fracción de electrones correspondientes al único oxígeno es (8/10). Por lo tanto, el *Z_{eff}* del agua es:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{0.2 \times 1^{2.94} + 0.8 \times 8^{2.94}} = 7.42$$

- 30 El *Z_{eff}* participa en la capacidad de las nanopartículas para la absorción de las radiaciones entrantes.

La siguiente tabla 1 proporciona ejemplos de compuestos de interés, e identifica su respectiva densidad y *Z_{eff}*.

Tabla 1:

Óxido	Fórmula	Z _{eff}	Densidad (g/cm ³)
Óxido de cerio (IV)	CeO ₂	53,40	7,2
Óxido de neodimio (III)	Nd ₂ O ₃	56,40	7,2
Óxido de samario (III)	Sm ₂ O ₃	58,39	7,6
Óxido de europio (III)	Eu ₂ O ₃	59,38	7,4
Óxido de gadolinio (III)	Gd ₂ O ₃	60,37	7,4
Óxido de terbio (III)	Tb ₂ O ₃	61,37	7,9
Óxido de disprosio (III)	Dy ₂ O ₃	62,36	7,8
Óxido de holmio	Ho ₂ O ₃	63,36	8,4
Óxido de erbio	Er ₂ O ₃	64,35	8,6

Óxido de tulio (III)	Tm ₂ O ₃	65,34	8,6
Óxido de iterbio	Yb ₂ O ₃	66,34	9,2
Óxido de lutecio	Lu ₂ O ₃	67,33	9,4
Óxido de hafnio (IV)	HfO ₂	67,26	9,7
Óxido de tantalio (IV)	TaO ₂	68,25	10,0
Óxido de tantalio (V)	Ta ₂ O ₅	67,24	8,2
Óxido de tungsteno (IV)	WO ₂	69,24	10,8
Óxido de tungsteno (VI)	WO ₃	67,27	7,2
Óxido de renio (IV)	ReO ₂	70,23	11,4
Óxido de osmio (IV)	OsO ₂	71,23	11,4
Óxido de iridio (IV)	IrO ₂	72,22	11,7
Óxido de platino (II)	PtO	75,46	14,1
Óxido de platino (IV)	PtO ₂	73,21	11,8
Óxido de mercurio (I)	Hg ₂ O	78,68	9,8
Óxido de mercurio (II)	HgO	77,45	11,1
Óxido de talio (III)	Tl ₂ O ₃	77,29	10,2
Óxido de plomo (II) (masicotita)	PbO	79,45	9,6
Óxido de plomo (IV)	PbO ₂	77,18	9,6
Óxido de plomo (II, IV)	Pb ₂ O ₃	78,28	10,1
Óxido de plomo (II, II, IV)	Pb ₃ O ₄	78,66	8,9
Óxido de polonio (IV)	PoO ₂	79,17	8,9
Óxido de bismuto	Bi ₂ O ₃	79,28	8,9
Óxido de niobio (II)	NbO	38,61	7,3
Óxido de rutenio (IV)	RuO ₂	39,63	7,1
Óxido de rodio (III)	Rh ₂ O ₃	41,55	8,2
Óxido de rodio (IV)	RhO ₂	40,61	7,2
Óxido de paladio (II)	PdO	43,57	8,3
Óxido de plata (I)	Ag ₂ O	45,72	7,2
Óxido de plata (II)	AgO	44,57	7,5
Óxido de cadmio	CdO	45,56	8,2
Óxido de indio	In ₂ O ₃	45,50	7,2

Tungstato	Fórmula	Z _{eff}	Densidad (g/cm ³)
Tungstato de hierro	FeWO ₄	61,1	7,5
Tungstato de cobre	CuWO ₄	60,8	7,5
Tungstato de plomo	PbWO ₄	73,6	8,5

- 5 A más alta densidad y Z_{eff} de la nanopartícula o agregado de nanopartículas, más eficiente es la absorción de las radiaciones ionizantes. La emisión de electrones y/o fotones de alta energía se amplifica entonces, después de la irradiación, mejorando de este modo la eficacia terapéutica.

- 10 Los inventores destacan sorprendentemente en esta memoria el papel fundamental y directo del parámetro densidad sobre la amplificación de la emisión de fotones y electrones, permitiendo dicha amplificación aplicaciones terapéuticas en un mamífero, como se explica aquí, cuando la densidad alcanza, y preferiblemente excede, el umbral de 7 g/cm³ (véase la parte experimental). Los ejemplos 4, 10 a) y 10 b) en lo que se refiere a nanopartículas de HfO₂ y CeO₂, proporcionan además resultados que destacan la sorprendente influencia de la densidad para un Z_{eff} constante.

Las nanopartículas o agregados según la presente invención, son ventajosamente biocompatibles, es decir, se pueden administrar de forma segura a un organismo animal, típicamente a un mamífero, en particular a un ser

humano, para proporcionar su efecto terapéutico. Dicha biocompatibilidad se puede asegurar, por ejemplo, por la naturaleza de los compuestos o materiales que constituyen la partícula y/o por una cubierta opcional.

5 Las nanopartículas o agregados preferidos según la invención, se cubren con una cubierta biocompatible. Cuando las nanopartículas y/o los agregados de la presente invención se administran a un sujeto por vía intravenosa (IV), tal cubierta biocompatible es particularmente ventajosa para optimizar la biodistribución de las nanopartículas y agregados en el contexto del efecto EPR descrito anteriormente. Se requiere una cubierta biocompatible completa de la nanopartícula o agregado, en particular en el contexto IV, con el fin de evitar la interacción de la superficie de la partícula con cualquier elemento de reconocimiento (macrófago, opsoninas, etc.). La "cubierta completa" implica la presencia de una densidad muy alta de moléculas biocompatibles capaces de crear al menos una monocapa completa sobre la superficie de la partícula. Dicha cubierta es responsable del llamado "efecto de sigilo" de la nanopartícula o agregado.

15 La cubierta biocompatible permite en particular la estabilidad de la nanopartícula a pH entre 6,5 y 7,5 en una suspensión biocompatible, tal como un fluido fisiológico (sangre, plasma, suero, etc.), cualquier medio isotónico o medio fisiológico, por ejemplo, un medio que comprende glucosa (al 5 %) y/o NaCl (al 0,9 %) (véase el ejemplo 11 y la figura 14), que es necesario para una administración farmacéutica.

Tal cubierta biocompatible se obtiene tratando la nanopartícula con un agente de tratamiento de superficie.

La estabilidad se puede confirmar mediante la cuantificación del extracto seco medido en una suspensión de nanopartículas antes y después de filtración por un filtro de 0,22 μm (véase el ejemplo 11 y la figura 15).

20 Ventajosamente, dicha cubierta conserva la integridad de las partículas *in vivo*, asegura o mejora la biocompatibilidad de las mismas, y facilita una funcionalización opcional de las mismas (por ejemplo, con moléculas espaciadoras, polímeros biocompatibles, agentes que se dirigen a objetivos, proteínas, etc.). Una nanopartícula especial, según la presente invención, comprende además, en efecto, un agente dirigido al objetivo que permite su interacción con un elemento de reconocimiento presente en la célula diana. Dichos agentes dirigidos al objetivo actuarán una vez que las nanopartículas o agregados se acumulan en el tumor. Como la conformación del agente dirigido al objetivo será responsable de su interacción con el objetivo, la densidad de dicho agente dirigido al objetivo deberá ser controlada cuidadosamente. Una densidad alta del mismo puede, en efecto, perturbar la conformación del agente dirigido al objetivo y en consecuencia su reconocimiento por el objetivo ("Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors"; J.A. Reddy, C. Abburi, H. Hofland, S.J. Howard, I. Vlahov, P. Wils & C. P. Leamon; Gene Therapy (2002) 9 p1542-1550 / "Folate targeting of drug carriers: A mathematical model"; Ketan B. Ghaghadaa,b, Justin Sauld,e, ayaganesh V Natarajanb,c, Ravi V. Bellamkondad,e, Ananth V. Annapragadaa,b,T; Journal of Controlled Release 104 (2005) 113-128). Además, una densidad alta del agente dirigido al objetivo puede favorecer el aclaramiento de las nanopartículas por el sistema retículo-endotelial (RES) durante la circulación en el sistema vascular.

35 La cubierta biocompatible puede estar compuesta de alguna estructura amorfa o cristalina. Es preferible que la cubierta permita la difusión de moléculas pequeñas y radicales libres. En particular, es importante que la cubierta permita el paso del agua (o el O_2) y, preferiblemente, el paso de su forma radical (la cubierta biocompatible no se disolverá a pH entre 6,5 y 7,5). Esto se puede conseguir utilizando materiales que sean porosos y/o añadiendo una capa de cubierta que tenga un espesor bajo y que sea porosa. Por lo tanto, una porosidad típica de la cubierta está comprendida entre aproximadamente 0,05 y 10 nm, preferiblemente 0,1 o 0,2 y 5 nm. Un espesor típico de la cubierta está generalmente comprendido entre aproximadamente 0,2 y 50 nm, por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 y 5 nm o aproximadamente 10 y 40 nm.

En general, la cubierta puede ser no biodegradable o biodegradable. Ambas opciones se pueden utilizar para el propósito de esta invención.

45 Son ejemplos de cubiertas no biodegradables uno o más materiales o agentes de tratamiento de superficie seleccionados del grupo que consiste en sílice, alúmina, azúcar (agarosa, por ejemplo), fosfato, silano, compuestos zwitteriónicos, lípidos, polímeros carbonados saturados (poli(óxido de etileno) por ejemplo) y polímeros inorgánicos, reticulados o no, modificados o no (polimetacrilato o poliestireno, por ejemplo), así como combinaciones de los mismos.

50 Son ejemplos de cubiertas biodegradables, por ejemplo, uno o más materiales o agentes de tratamiento de superficie seleccionados del grupo que consiste en una molécula biológica, modificada o no, natural o no, y un polímero molecular biológico; modificado o no, de forma natural o no. El polímero biológico puede ser un fosfolípido, un sacárido, un oligosacárido o un polisacárido, polisulfatado o no, por ejemplo, dextrano.

55 Los materiales mencionados antes, compuestos o agentes de tratamiento de superficie, se pueden usar solos o en combinaciones, mezclas o ensamblajes, combinados o no, covalentes o no, opcionalmente en combinación con otros compuestos. Por otra parte, también es posible utilizar uno cualquiera de los materiales mencionados antes, siendo dicho material naturalmente soluble en agua o soluble en lípidos o siendo modificado artificialmente para llegar a ser soluble en agua o soluble en lípidos.

La cubierta biocompatible comprende preferiblemente o está hecha de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en un agente inorgánico, un agente metálico, un agente orgánico, y una mezcla o combinación de los mismos.

5 El agente inorgánico apropiado se puede seleccionar del grupo que consiste en un óxido, un hidróxido, y un oxihidróxido. El agente inorgánico puede comprender, por ejemplo, silicio, aluminio, zirconio, calcio, magnesio y/o estaño.

Tales agentes se pueden utilizar para cargar la nanopartícula, ya sea positiva o negativamente con el fin de modular las interacciones de dicha nanopartícula con los medios biológicos.

10 Un agente inorgánico seleccionado del grupo que consiste en, por ejemplo, magnesio y calcio, llevará una carga positiva a la superficie de la nanopartícula a un pH 7.

Por ejemplo, se puede utilizar el silicio para llevar una carga negativa a la superficie de la nanopartícula a un pH 7.

El agente metálico apropiado se puede seleccionar del grupo que consiste en oro, plata y platino.

Un agente orgánico apropiado puede ser cualquier agente que comprenda una función capaz de interactuar con una nanopartícula según la presente invención y una función capaz de conferir biocompatibilidad a dicha nanopartícula.

15 El agente que comprende una función capaz de interactuar con una nanopartícula puede ser, por ejemplo, un carboxilato (R-COO⁻), un sulfato (R-SO₄²⁻), un alcohol (R-OH), un silano (R-Si(OR)₃), una amina (R-NH₂), un amonio cuaternario (R-NH₄⁺), una función fosfónica (R-PO(OH)₂) o una función fosfórica (RO-PO(OH)₂).

20 El agente que comprende una función capaz de conferir biocompatibilidad a una nanopartícula según la presente invención, puede tener una función estérica y/o una función electrostática. Tal agente con una función estérica se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), óxido de polietileno, alcohol polivinílico, poliácido, poliácridamida (poli(N-isopropilacrilamida)), policarbamida, un biopolímero o un polisacárido tal como dextrano, xilano, celulosa, colágeno, y un compuesto zwitteriónico tal como polisulfobetaina, etc.

El agente con una función electrostática positiva puede ser una amina tal como aminopropiltriétoxilano, o polilisina.

25 El agente con una función electrostática negativa se puede seleccionar del grupo que consiste en fosfato (por ejemplo, un polifosfato, un metafosfato, un pirofosfato, etc.), carboxilato (por ejemplo, citrato o ácido dicarboxílico, en particular, ácido succínico) y sulfato.

La cubierta puede contener también diferentes grupos funcionales (o segmentos de enlace), que permiten que cualquier molécula de interés se una a la superficie de la partícula.

30 Un ejemplo típico de una nanopartícula según la invención es una nanopartícula hecha de HfO₂ que comprende un compuesto de fosfato tal como trimetafosfato de sodio (STMP) o hexametafosfato de sodio (HMP) como una cubierta biocompatible.

35 Otro ejemplo de una nanopartícula según la invención es una nanopartícula hecha de HfO₂, que comprende, como una cubierta biocompatible, un silano que lleva al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un agente metálico, polietileno, un óxido, una amina, un anhídrido, un fosfato y cualquier combinación de los mismos.

Otro objetivo descrito en la presente memoria, se refiere a un método para producir una nanopartícula o agregado de nanopartículas tal como se ha definido aquí antes o una mezcla de los mismos, que comprende:

- 40 – proporcionar un elemento químico que permite la preparación de un material inorgánico que comprende oxígeno, siendo la densidad de dicho material de al menos 7 g/cm³, preferiblemente por encima de 7 g/cm³, en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm³ y por debajo de 15 g/cm³,
- preparar una nanopartícula o agregado de nanopartículas a partir de dicho elemento químico por precipitación de dicho elemento químico en un medio polar (tal como una solución acuosa, una solución alcohólica, etc.) y por cristalización, y, opcionalmente
- 45 – recubrir la nanopartícula o agregado utilizando un agente de tratamiento de superficie como se ha descrito previamente.

Durante la etapa de precipitación:

- el pH se ajusta preferiblemente, ventajosamente, entre aproximadamente 7 y 14;
- la concentración del precursor (elemento químico) se ajusta preferiblemente, ventajosamente, entre aproximadamente 10⁻³ y 3 mol/L;

- la fuerza iónica se ajusta preferiblemente, ventajosamente, entre aproximadamente 10^{-3} mol/L y 5 mol/L; preferiblemente entre aproximadamente 10^{-3} mol/L y 3 mol/L;
- la temperatura se ajusta preferiblemente, ventajosamente, entre aproximadamente 20 °C y 350 °C.

5 Antes de ser opcionalmente recubierto, el material inorgánico se recristaliza preferiblemente, por ejemplo, por medio de tratamiento térmico (dicho tratamiento puede ir seguido por una etapa de molienda seca o húmeda). Las etapas de precipitación y cristalización se pueden llevar a cabo de forma simultánea o secuencial.

Se puede añadir además un agente secuestrante (complejante) al medio de polar para ayudar a alcanzar la fase de cristalización, cristalinidad, forma de las partículas, tamaño de partícula y/o densidad deseadas.

10 El material cristalizado también puede ser lavado (para eliminar cualquier impureza) y/o peptizado (para llevar una carga eléctrica sobre la superficie de la partícula inorgánica con el fin de conferir estabilidad a dicha nanopartícula a un pH dado).

La etapa de recubrimiento consiste ventajosamente en poner la nanopartícula o agregado de nanopartículas en contacto con un agente de tratamiento de superficie (llamado también en esta memoria "recubrimiento") como se ha definido previamente.

15 En un aspecto particular de la descripción, un método para producir una suspensión de nanopartículas biocompatibles, agregados de nanopartículas o una mezcla de los mismos, comprende las siguientes etapas, preferiblemente en orden:

- 20 a) proporcionar como precursor, un elemento químico del grupo de los lantánidos, o del período 5 o 6 de la tabla periódica, que es capaz de formar un material inorgánico que comprende oxígeno, en particular, un óxido o un tungstato, preferiblemente un óxido, siendo la densidad de dicho material de al menos 7 g/cm^3 , preferiblemente por encima de 7 g/cm^3 , en particular, para una nanopartícula hecha de un óxido, por encima de 7 g/cm^3 y por debajo de 15 g/cm^3 , en particular, entre 8 y 14 g/cm^3 , u 8 y 12 g/cm^3 ,
- 25 b) precipitar el precursor de la etapa a) en un medio polar, preferiblemente mediante el ajuste del pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio y/o la concentración del precursor, y añadiendo opcionalmente un agente complejante,
- c) opcionalmente cristalizar el precipitado mediante un tratamiento térmico,
- d) opcionalmente lavar la suspensión obtenida al final de la etapa b) o c) para eliminar cualquier impureza, sal y/o agente complejante presente en la misma,
- 30 e) opcionalmente realizar una etapa de peptización con el fin de llevar una carga a la superficie de las nanopartículas o agregados presentes en la suspensión, y opcionalmente
- f) recubrir las nanopartículas o agregados.

El pH de la suspensión de nanopartículas o agregados de nanopartículas obtenida con un método como el descrito anteriormente, se puede ajustar con un medio fisiológico (a pH entre 6,5 y 7,5).

35 Las suspensiones descritas anteriormente se pueden someter además a una etapa de formulación antes de ser administradas a un sujeto.

En un ejemplo particular, un método para producir una nanopartícula o agregado de nanopartículas, estando la nanopartícula hecha de, o comprendiendo un núcleo de, HfO_2 , comprende preferiblemente las siguientes etapas, en orden:

- 40 - precipitar una solución de precursor de hafnio (tal como en particular solución de HfCl_4 o HfOCl_2) con una base, tal como, en particular, hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH),
- cristalizar la suspensión inorgánica amorfa obtenida de este modo, por ejemplo, por medio de tratamiento térmico por encima de 50 °C, preferiblemente al menos 100 °C, mientras se agita opcionalmente la suspensión,
- opcionalmente lavar y/o peptizar el material cristalizado obtenido de este modo,
- 45 - opcionalmente recubrir dicho material cristalizado poniendo dicho material en contacto con un agente de tratamiento de superficie como se ha definido previamente.

Otro objetivo de la descripción se basa en cualquier composición que comprende nanopartículas o agregados tales como se han definido anteriormente en esta memoria y/o que se pueden obtener por los métodos descritos aquí. Aunque no es obligatorio, las partículas de las composiciones descritas en esta memoria tienen ventajosamente un tamaño y forma bastante homogéneos.

Un objetivo particular de la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende partículas o agregados de nanopartículas tales como se han definido anteriormente en esta memoria y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Otro objetivo particular de la descripción se refiere a una composición para diagnóstico o para formación de imágenes que comprende partículas o agregados de nanopartículas tales como se han definido anteriormente y, opcionalmente, un excipiente o vehículo fisiológicamente aceptable.

Las composiciones pueden estar en la forma de un sólido, líquido (partículas en suspensión), aerosol, gel, pasta, y similares. Las composiciones preferidas están en forma líquida.

- 10 El excipiente o vehículo que se emplea puede ser cualquier soporte clásico para este tipo de aplicación, tal como por ejemplo soluciones salinas, isotónicas, estériles, tamponadas, y similares. También pueden comprender estabilizantes, edulcorantes, tensioactivos.

Se pueden formular por ejemplo como ampollas, aerosoles, frascos, comprimidos, cápsulas, utilizando técnicas conocidas de formulación farmacéutica.

- 15 En las composiciones descritas en esta memoria, las concentraciones apropiadas o deseables de nanopartículas están comprendidas entre aproximadamente 10^{-3} mg de nanopartículas por gramo de tumor y aproximadamente 100 mg de nanopartículas por gramo de tumor, en particular entre aproximadamente 5 y 50 mg de nanopartículas por gramo de tumor. Esto incluye diferentes vías de administración.

- 20 En general, las composiciones en forma líquida comprenden entre 0,05 g/L y 300 g/L de nanopartículas, 0,05 g/L y 150 g/L, preferiblemente al menos 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 80 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L o 250 g/L.

El extracto seco se mide idealmente después de una etapa de secado de la suspensión que comprende las nanopartículas.

Las composiciones, las partículas y los agregados de la invención, se pueden utilizar en muchos campos, particularmente en medicina humana o veterinaria.

- 25 Es un objetivo de la presente descripción utilizar una nanopartícula o agregado de nanopartículas como se describe aquí, para alterar, destruir o eliminar una célula, tejido u órgano diana.

Bajo el efecto de las radiaciones ionizantes, rayos X, rayos gamma, isótopos radiactivos y/o haces de electrones en particular, las nanopartículas se excitan y producen electrones y/o fotones de alta energía.

- 30 Dichos electrones y/o fotones de alta energía, al entrar en contacto con el medio circundante, agua u O_2 en particular, pueden generar radicales libres y/o nuevas ionizaciones.

Dependiendo de la energía de las radiaciones ionizantes, las partículas pueden permitir así la destrucción de tejidos y/o, simplemente, una visualización para formación de imágenes y/o para fines de diagnóstico.

- 35 Por lo tanto, se divulga aquí el uso de una nanopartícula o agregado de nanopartículas como se describe en la presente memoria, para preparar una composición farmacéutica destinada a alterar, destruir o eliminar células diana en un animal, cuando dichas células se exponen a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes, y los métodos correspondientes.

El producto farmacéutico puede comprender además un compuesto terapéutico adicional, distinto de una nanopartícula o agregado de nanopartículas, destinado también a tratar el cáncer.

- 40 Otro objetivo particular descrito aquí se basa en un método para inducir o causar la lisis, apoptosis o destrucción de células diana, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprende poner en contacto las células, en particular las células diana, con una o más nanopartículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido anteriormente en esta memoria, durante un período de tiempo suficiente para permitir que las partículas o agregados penetren dentro de las células diana o interactúen con dichas células y, exponer las células a radiaciones, siendo las radiaciones apropiadas, en particular, radiaciones ionizantes, preferiblemente rayos X, rayos gamma, isótopos radiactivos y/o haces de electrones, induciendo o causando dicha exposición la lisis, apoptosis o destrucción de dichas células diana.

- 50 Las células diana pueden ser cualquier célula patológica, es decir, las células implicadas en un mecanismo patológico, por ejemplo, células proliferativas, tales como células tumorales, células estenosantes (células de fibroblastos/músculo liso), o células del sistema inmunitario (clones de células patológicas). Una aplicación preferida se basa en el tratamiento (por ejemplo, la destrucción o alteración funcional) de las células o tejidos malignos.

A este respecto, un objetivo particular descrito aquí se basa en el uso de composiciones, partículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido antes en esta memoria (en combinación con radiaciones ionizantes como se ha definido previamente) para producir una composición farmacéutica destinada al tratamiento del cáncer.

5 La presente divulgación incluye además el uso de composiciones, partículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido antes en esta memoria, para prevenir o tratar un cáncer o para aliviar los síntomas de un cáncer en un animal, cuando dichas células se exponen a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes como se ha definido previamente.

10 Otro objetivo particular descrito aquí se basa en partículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido antes en esta memoria, para uso en un método para inducir o causar la lisis o destrucción de células cancerosas, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una o más partículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido antes en esta memoria, durante un período de tiempo suficiente para permitir que las partículas o agregados penetren dentro de las células cancerosas o interactúen con dichas células y, exponer las células a radiaciones, en particular a las radiaciones ionizantes como se han definido previamente, induciendo o causando dicha exposición la lisis o destrucción de dichas células.

15 Otro objetivo descrito aquí se refiere a una composición, a nanopartículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido antes en esta memoria, para uso en un método para prevenir o tratar un cáncer o para aliviar los síntomas de un cáncer en un sujeto o paciente, que comprende administrar al paciente que sufre de un cáncer dicha composición, nanopartículas o agregados de nanopartículas como se han definido anteriormente, en condiciones que permitan que las partículas o agregados de nanopartículas penetren dentro de las células anormales o interactúen con dichas células, en particular células cancerosas, y posteriormente tratar al sujeto en presencia de una fuente de excitación, en particular una fuente de radiaciones ionizantes, llevando a una alteración, perturbación o destrucción funcional de las células anormales del paciente, y de este modo prevenir o tratar un cáncer.

El tratamiento clásico del cáncer implica sistemáticamente la concurrencia de tratamientos multimodales (combinación de radioterapia y quimioterapia, por ejemplo).

25 Las nanopartículas descritas en esta memoria, sometidas a radiaciones ionizantes, en el contexto de la radioterapia, se pueden utilizar en asociación con un protocolo diferente de terapia de cáncer. Dicho protocolo se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, radiocirugía, quimioterapia, un tratamiento que comprende la administración de citostáticos, citotóxicos, una terapia dirigida, una vacuna, radionucleidos, y cualquier otro producto biológico o inorgánico destinado a tratar el cáncer.

30 De modo sorprendente, las nanopartículas descritas aquí se pueden utilizar además en el contexto de la radioterapia sola con aumento observado de la eficacia.

35 La invención se puede utilizar para tratar cualquier tipo de tumor maligno, tal como los tumores o tumores malignos hematológicos, y los tumores sólidos, en particular de origen epitelial, neuroectodérmico o mesenquimatoso. Además, las nanopartículas se pueden utilizar para tratar una lesión premaligna o una enfermedad benigna específica donde la terapia de radiación se utiliza clásicamente y/o está indicada.

La invención es aplicable, en el contexto de la terapia, a los tumores primarios, o invasiones secundarias, metástasis loco-regionales o distantes, y en el contexto de la profilaxis, a fin de evitar la afectación secundaria maligna del sistema nervioso central tal como las invasiones observadas (metástasis) de melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de mama, etc.

40 Las nanopartículas se pueden utilizar en cualquier momento durante el período de tratamiento anticáncer. Se pueden administrar por ejemplo como un neoadyuvante (antes de la intervención quirúrgica para la extirpación del cáncer) o como un adyuvante (después de la cirugía).

Las nanopartículas se pueden utilizar también para tumores avanzados que no se pueden extirpar quirúrgicamente.

45 Como se explica en la presente memoria, la irradiación se puede aplicar en cualquier momento después de la administración de las partículas, en una o más ocasiones, mediante el uso de cualquier sistema disponible en la actualidad de radioterapia o radiografía.

50 Las nanopartículas descritas aquí se destinan en particular a ser utilizadas para tratar un cáncer donde la radioterapia es un tratamiento clásico. Dicho cáncer se puede seleccionar en particular del grupo que consiste en cáncer de piel, incluyendo neoplasmas malignos asociados con el SIDA, melanoma; tumores del sistema nervioso central, incluyendo los tumores de cerebro, tronco encefálico, cerebelo, hipófisis, conducto raquídeo, el ojo y la órbita; tumores de cabeza y cuello; cánceres de pulmón; cánceres de mama; tumores gastrointestinales, tales como los cánceres de hígado y del tracto hepatobiliar, cánceres de colon, recto y anal, cáncer de estómago, páncreas, esófago; tumores genitourinarios masculinos, tales como los cánceres de próstata, testículos, pene y uretra; tumores ginecológicos, tales como los cánceres de cuello uterino, de endometrio, ovarios, trompa de Falopio, vagina y vulva; los tumores suprarrenales y retroperitoneales; sarcomas de hueso y tejidos blandos, independientemente de la

localización; linfoma; mieloma; leucemia; y tumores pediátricos tales como el tumor de Wilm, neuroblastoma, tumores del sistema nervioso central, sarcoma de Ewing, etc.

5 Las partículas pueden ser excitadas dentro de un gran intervalo de dosis total de irradiación. Las cantidades y los programas (planificación y administración de irradiaciones en una sola dosis, o en el contexto de un protocolo fraccionado o hiperfraccionado, etc.) se definen para cualquier enfermedad / sitio anatómico / estadio de la enfermedad del paciente / edad del paciente (niños, adultos, pacientes de edad avanzada), y constituye el estándar de cuidados para cualquier situación específica.

10 La irradiación se puede aplicar en cualquier momento después de la administración de las partículas, en una o más ocasiones, mediante el uso de cualquier sistema actualmente disponible de radioterapia o radiografía. Las partículas se pueden administrar por diferentes vías tales como vía local (intra-tumoral (IT) en particular), subcutánea, intravenosa (IV), intradérmica, intraarterial, vías respiratorias (inhalación), intraperitoneal, intramuscular y oral (*per os*). Las partículas se pueden administrar además en una intracavidad tal como la cavidad virtual del lecho tumoral después de la tumorectomía.

Se pueden realizar inyecciones o administraciones repetidas, cuando sea apropiado.

15 El término "tratamiento" indica cualquier acción realizada para corregir funciones anormales, prevenir enfermedades, mejorar signos patológicos, tales como, en particular, la reducción en el tamaño o crecimiento de un tejido anormal, en particular de un tumor, el control de dicho tamaño o crecimiento, la supresión o destrucción de células o tejidos anormales, la ralentización de la progresión de la enfermedad, la estabilización de la enfermedad con retraso de la progresión del cáncer, la reducción de la formación de metástasis, la regresión de una enfermedad o la remisión completa (en el contexto de cáncer, por ejemplo), etc.

20 Como se ha indicado previamente, las radiaciones o fuentes de excitación apropiadas son preferiblemente radiaciones ionizantes y se pueden seleccionar ventajosamente del grupo que consiste en rayos X, rayos gamma, haces de electrones, haces de iones e isótopos radiactivos o emisiones de radioisótopos. Los rayos X son una fuente de excitación particularmente preferida.

25 Las radiaciones ionizantes son típicamente de aproximadamente 2 keV a aproximadamente 25.000 keV, en particular de aproximadamente 2 keV a aproximadamente 6000 keV (fuente LINAC), o de aproximadamente 2 keV a aproximadamente 1500 keV (tal como una fuente de cobalto 60).

En general, y de manera no restrictiva, los siguientes rayos X se pueden aplicar en diferentes casos para excitar las partículas:

- 30
- Rayos X superficiales de 2 a 50 keV: para excitar las nanopartículas cerca de la superficie (penetración de unos milímetros);
 - Rayos X de 50 a 150 keV: en diagnóstico, pero también en terapia;
 - Rayos X (ortovoltaje) de 200 a 500 keV que pueden penetrar un espesor de tejido de 6 cm;
 - Rayos X (megavoltaje) de 1000 keV a 25.000 keV. Por ejemplo, la excitación de las nanopartículas para el
- 35
- tratamiento del cáncer de próstata se puede realizar por medio de cinco rayos X enfocados con una energía de 15.000 keV.

Los isótopos radiactivos, se pueden utilizar alternativamente como una fuente de radiación ionizante (denominada curieterapia o braquiterapia). En particular, se pueden utilizar ventajosamente, yodo I^{125} ($t_{1/2} = 60,1$ días), paladio Pd^{103} ($t_{1/2} = 17$ días), cesio Cs^{137} e iridio Ir^{192} .

40 Las partículas cargadas tales como haces de protones, haces de iones tal como carbono, en particular, haces de iones de alta energía, se pueden utilizar también como una fuente de radiación ionizante y/o haces de neutrones.

Los haces de electrones se pueden utilizar también como una fuente de radiación ionizante con energía comprendida entre 4 MeV y 25 MeV.

45 Se podrían utilizar fuentes específicas de irradiación monocromática para generar selectivamente radiación de rayos X de una energía próxima a, o correspondiente a, la absorción deseada de rayos X en el borde de los átomos del óxido de la nanopartícula o agregado de nanopartículas.

Preferiblemente, las fuentes de radiaciones ionizantes se pueden seleccionar entre las fuentes de Acelerador lineal (LINAC), cobalto 60 y braquiterapia.

50 En el campo del diagnóstico, las nanopartículas de la invención se pueden utilizar como agentes de contraste, para detectar y/o visualizar cualquier tipo de tejido. Por lo tanto, un objetivo descrito en esta memoria es el uso de composiciones, partículas o agregados de nanopartículas tal como se han definido anteriormente, en combinación

con radiaciones, utilizando en particular dispositivos de radiografía, para producir una composición destinada a la detección o la visualización de células, tejidos u órganos.

El término "en combinación" indica que se obtiene el efecto buscado cuando las células, tejidos u órganos de interés, que tienen parcialmente incorporadas las nanopartículas de la invención, son excitados por la fuente definida. Sin embargo, no es necesario que las partículas y los rayos sean administrados simultáneamente, ni según el mismo protocolo.

La presente divulgación proporciona además kits que comprenden una cualquiera o más de las nanopartículas o composiciones descritas en esta memoria. Típicamente, el kit comprende al menos una nanopartícula o agregado de nanopartículas como se ha descrito aquí. Generalmente, el kit comprende también uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria. Asociado con tal recipiente o recipientes, se puede proporcionar un prospecto con instrucciones para el uso de las nanopartículas, agregados de nanopartículas o composiciones según los presentes métodos.

Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto en los siguientes ejemplos.

Sección experimental

15 Ejemplo 1: Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de hafnio (HfO_2) con una densidad superior a 7 g/cm^3 , utilizando trimetafosfato de sodio como agente de recubrimiento.

Se añade una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a 40 g de solución de HfCl_4 . La adición de la solución de TMAOH se realiza hasta que el pH de la suspensión final alcance un pH comprendido entre 7 y 13. Se obtiene un precipitado blanco.

20 El precipitado se transfiere después a un autoclave y se calienta a una temperatura comprendida entre $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y $300 \text{ }^\circ\text{C}$ para llevar a cabo la cristalización. Después de enfriar, se lava la suspensión con agua desionizada.

Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de las nanopartículas o agregados de nanopartículas.

25 A continuación, se añade la suspensión de trimetafosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de trimetafosfato de sodio añadida, inferior la dosis letal (LD) 50/5) y se ajusta el pH de la suspensión a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5.

Para los experimentos *in vitro* se realiza una etapa de esterilización en esta fase, utilizando un filtro de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$.

Para los experimentos *in vivo*, se puede realizar una etapa de formulación utilizando glucosa al 5 % antes o después de la etapa de esterilización.

30 La siguiente tabla presenta las principales características de la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas obtenida de este modo.

Densidad	Morfología (Véase la figura 2A)	Superficie específica (SS) en m^2/g	Diámetro hidrodinámico medio (Φ) en nm
8,5	Forma esférica	$20 < \text{SS} < 60$	$15 < \Phi < 200$

Ejemplo de referencia 2: Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de hafnio (HfO_2) con una densidad inferior a 7 g/cm^3 , utilizando trimetafosfato de sodio como agente de recubrimiento.

35 Se añade una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a 40 g de solución de HfCl_4 . La adición de solución de TMAOH se realiza hasta que el pH de la suspensión final alcance un pH comprendido entre 1 y 5. Se obtiene un precipitado blanco.

El precipitado se transfiere después a un autoclave y se calienta a una temperatura comprendida entre $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y $300 \text{ }^\circ\text{C}$ para llevar a cabo la cristalización. Después de enfriar, se lava la suspensión con agua desionizada.

40 Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de las nanopartículas o agregados de nanopartículas.

A continuación, se añade la suspensión de trimetafosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de trimetafosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5.

Para los experimentos *in vitro* se realiza una etapa de esterilización en esta fase, utilizando un filtro de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$.

45 Para los experimentos *in vivo*, se puede realizar una etapa de formulación utilizando glucosa al 5 % antes o después de la etapa de esterilización.

La siguiente tabla presenta las principales características de la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas obtenida de este modo.

Densidad	Morfología	Superficie específica (SS) en m ² /g	Diámetro hidrodinámico medio (Φ) en nm
6,5	Forma esférica	20 < SS < 60	15 < Φ < 200

Ejemplo 3: Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de hafnio (HfO₂) con una densidad superior a 7 g/cm³, utilizando hexametáfosfato de sodio como agente de recubrimiento.

- 5 Se añade una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a 40 g de solución de HfCl₄. La adición de solución de TMAOH se realiza hasta que el pH de la suspensión final alcance un pH comprendido entre 7 y 13. Se obtiene un precipitado blanco.

El precipitado se transfiere después a un autoclave y se calienta a una temperatura comprendida entre 120 °C y 300 °C para llevar a cabo la cristalización. Después de enfriar, se lava la suspensión con agua desionizada.

- 10 Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de las nanopartículas o agregados de nanopartículas.

A continuación, se añade una suspensión de hexametáfosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de hexametáfosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5.

- 15 Para los experimentos *in vitro* se realiza una etapa de esterilización en esta fase, utilizando un filtro de 0,22 μm.

Para los experimentos *in vivo*, se puede realizar una etapa de formulación utilizando glucosa al 5 % antes o después de la etapa de esterilización.

La siguiente tabla presenta las principales características de la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas obtenida de este modo.

Densidad	Morfología (Véase la figura 2A)	Superficie específica (SS) en m ² /g	Diámetro hidrodinámico medio (Φ) en nm
8,3	Forma esférica	20 < SS < 60	15 < Φ < 200

20

Ejemplo 4:

Análisis de supervivencia de las células o análisis de la fracción de supervivencia a x grays (SF_x) utilizando una suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ como se ha preparado en el ejemplo 1 y ejemplo 2 (figura 5B).

- 25 Materiales y método

Se determinó la eficiencia de cultivo en placas para cada línea celular de cáncer de colon (células cancerosas HCT116 radiosensibles y HT29 radiorresistentes) antes de la determinación de SF_x. Se pusieron las células en placas de manera que se formaron 50 a 200 colonias por placa, y se incubaron entre 3 horas y toda la noche a 37 °C para permitir la adherencia. Se trataron entonces las células durante un tiempo máximo de incubación de 24 horas con nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ a 400 μM tanto del ejemplo 1 (con una densidad igual a 8,5) como del ejemplo 2 (con una densidad igual a 6,5).

30

Se llevó a cabo la irradiación utilizando una irradiación de 4 Gy para las células cancerosas HT29 y una irradiación de 2 Gy para las células cancerosas HCT116, con un irradiador de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu). Después de la irradiación, se incubaron las células durante más de 8 días a 37 °C antes de ser teñidas con cristal violeta al 0,5 % en metanol absoluto. Se contaron sólo las colonias con al menos 50 células. Se determinó la SF_x por la siguiente fórmula:

35

$$SF_x = \left[\frac{\text{(número de colonias a dosis } x)}{\text{(número total de células puestas en placas a dosis } x)} \right] \times \text{eficiencia de cultivo en placas}$$

Resultados: Efecto de la densidad sobre las células radiosensibles o radiorresistentes

- 40 Como se muestra en la figura 5B, la irradiación casi no tuvo ningún efecto significativo tanto sobre las células cancerosas radiosensibles (HCT116) como sobre las radiorresistentes (HT29) que tienen incorporadas o que están en contacto con las nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 2 (densidad igual a 6,5), en comparación con las células de control no tratadas. Sin embargo, el tratamiento de las células cancerosas con nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 1 (densidad igual a 8,5), dio como resultado un

aumento significativo en el nivel de muerte celular inducida por la radiación tanto en las células cancerosas radiosensibles (HCT116) como en las radiorresistentes (HT29).

Ejemplo 5:

5 Ensayo clonogénico utilizando la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 3 (figura 8):

10 La supervivencia celular se cuantificó por el ensayo normalizado de formación de colonias. Se transfirieron las placas de cultivo de vidrio al acelerador lineal inmediatamente después de un tiempo máximo de incubación de 24 horas de las células con las nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ (400 µM). Se irradiaron las células con una dosis diferente de irradiación (tasa de dosis: 1 Gy/min, 200 keV: Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu, a temperatura ambiente).

15 Los resultados sobre ambas células cancerosas, radiosensibles y radiorresistentes (figura 8) indican la relación de aumento de la radiación (ER) para las nanopartículas. Las células HT29 mostraron una ER de 1,60 para la dosis de 4 Gy sola, mientras que las células HCT116 presentaron una ER de 1,33 para la dosis equivalente. Estos datos demuestran que las nanopartículas en combinación con las radiaciones son responsables de la inhibición clonogénica correlacionada con una reducción de la supervivencia celular tanto en las líneas celulares radiosensibles como en las radiorresistentes.

Ejemplo 6:

Ensayo de viabilidad celular utilizando la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 3 (figura 10):

20 La viabilidad celular se midió utilizando el kit WST-1 después de un período de tratamiento de 24 horas con o sin nanopartículas (800 µM) con dosis variables de irradiación (hasta 6 Gy) utilizando una irradiación de rayos X de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu). Los efectos de las nanopartículas se presentan en la figura 10.

25 La presencia de nanopartículas a 800 µM lleva a una disminución de la viabilidad celular en comparación con un control privado de toda nanopartícula. Las nanopartículas sometidas a 1 Gy de irradiación de rayos X lleva a una eficacia similar cuando se compara con un control sometido a una irradiación de 3 Gy de rayos X (radioterapia sola).

No se observó ningún signo de toxicidad con nanopartículas solas.

Los experimentos realizados con 10 concentraciones diferentes, mostraron resultados consistentes.

30 Esto demuestra claramente el efecto de aumento de la dosis de las nanopartículas. Sorprendentemente, se observan propiedades eficientes a una dosis baja de radioterapia: esto indica el posible uso de nanopartículas utilizando protocolos de radioterapia regular, pero también ofrece la promesa de una potencial reducción de la dosis usual de radioterapia para una eficacia similar o mejor que el tratamiento habitual.

Ejemplo 7:

35 Dispersión de nanopartículas después de inyección intra-tumoral utilizando la suspensión biocompatible de nanopartículas del ejemplo 3 (figura 1):

40 La suspensión de nanopartículas se ha inyectado intratumoralmente a ratones suizos atómicos portadores de tumores HCT116. El tiempo de residencia de las nanopartículas en el tumor es de al menos 15 días, y no ha sido posible una investigación más larga debido al sacrificio de los ratones requerido por razones éticas. Además, las nanopartículas presentan un nivel de contraste alto y son fácilmente detectables por microtomografía de rayos X. Por lo tanto, se ha realizado una microtomografía 2 y 15 días después de la inyección de nanopartículas con el fin de evaluar la posibilidad de fugas de producto desde el tumor. Parece que la distribución en el tumor sigue siendo equivalente entre 2 y 15 días y que las nanopartículas permanecen en el tumor (más de 15 días).

Ejemplo 8:

45 Estudio de funcionamiento de las nanopartículas en un modelo de tumor HCT116 utilizando las nanopartículas del ejemplo 3 (figuras 6, 7 y 9):

50 La suspensión de nanopartículas ha sido inyectada intra-tumoralmente a ratones suizos atómicos portadores de tumores HCT116 injertados en el flanco. Se ha realizado la irradiación local del tumor con un aplicador acoplado a una irradiación externa utilizando el dispositivo de curieterapia con fuentes de iridio-192. La posición y el tiempo de residencia de las fuentes de iridio-192 cerca del tumor se ha optimizado con el fin de administrar al tumor una dosis de irradiación de 4 u 8 grays por fracción. Un grupo de ratones ha sido inyectado intra-tumoralmente con nanopartículas (el volumen inyectado está entre 20 % y 50 % del volumen del tumor) y se ha sometido o no a dos fracciones de irradiaciones de 4 grays (24 y 48 horas después de la inyección).

5 Un segundo grupo ha sido inyectado intra-tumoralmente con nanopartículas (el volumen inyectado está entre 20 % y 50 % del volumen del tumor) y se ha sometido o no a una sola fracción de irradiaciones de 8 grays (24 horas después de la inyección). Los 4 grupos de ratones se comparan con los animales tratados con el vehículo sometidos o no a radioterapia. El volumen del tumor se controla en cada grupo, dos veces por semana. Las nanopartículas llevan a una regresión total del tumor en comparación con los ratones control sometidos a radioterapia sola. La evaluación el día 20 después de la irradiación, demostró una inhibición del crecimiento del tumor igual al 100 % en los ratones tratados con nanopartículas después de una irradiación de 2x4 grays o 1x8 grays cuando se compara con el control sometido a radioterapia sola con el mismo programa de dosificación.

10 La utilización de irradiación fraccionada ha demostrado una mejor relación beneficio-riesgo en comparación con un grupo de referencia irradiado. En este contexto, es posible un protocolo fraccionado que utiliza dosis bajas de radioterapia. Un protocolo de este tipo permite una mejor relación beneficio-riesgo en comparación con el protocolo de radioterapia regular. En efecto, un protocolo fraccionado de este tipo reduce los efectos secundarios perjudiciales que se pueden observar con los protocolos convencionales sobre los tejidos sanos y es responsable de una eficacia del tratamiento equivalente o incluso mejor.

15 Ejemplo 9:

Ensayo clonogénico utilizando la suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 3, utilizando o bien una fuente de rayos X de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu) o una fuente de cobalto 60 (figura 11A y 11B):

Materiales y método

20 Se determinó la eficiencia de cultivo en placas para la línea de células cancerosas HCT1080 (células cancerosas radorresistentes) antes del análisis de supervivencia celular o fracción de supervivencia a x grays (SF_x). Las células se pusieron en placas a una densidad para formar entre 50 y 200 colonias según el tratamiento. Cuando las células están unidas, se añaden nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ a 400 µM del ejemplo 3 (con una densidad igual a 8,3 g/cm³), con un tiempo máximo de incubación de 24 horas. Se llevó a cabo la irradiación celular utilizando un irradiador de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu) (figura 11A) y una fuente de cobalto 60 (figura 11B). Después de la irradiación, se incubaron las células durante aproximadamente 8 días a 37 °C antes de ser fijadas y teñidas con solución de cristal violeta. Sólo se contaron las colonias que comprenden al menos 50 células. La SF_x se determinó utilizando la siguiente fórmula:

30 $SF_x = \frac{[\text{número de colonias}] \text{ a dosis } x}{[\text{número total de células puestas en placas}] \text{ a dosis } x} \times \text{eficiencia de cultivo en placas}$

Resultados: Efecto de la irradiación sobre las células radorresistentes

35 Como se muestra en las figuras 11A y 11B, el tratamiento de las células cancerosas con nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO₂ del ejemplo 3 (densidad igual a 8,3), da como resultado un aumento significativo en el nivel de muerte celular inducida por la radiación en las células cancerosas radorresistentes (HT1080) irradiadas con un irradiador de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu) o con una fuente de cobalto 60.

40 Los resultados indican la relación de aumento de la radiación (ER) de las nanopartículas. Las células HT1080 mostraron una ER de 1,38 para la dosis de 4 Gy sola, con una fuente de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu) y se observa una ER de 1 para la dosis equivalente cuando se utiliza una fuente de cobalto 60. Estos datos demuestran que las nanopartículas son responsables de una ventajosa inhibición clonogénica de las líneas celulares HT1080 radorresistentes irradiadas utilizando o bien una fuente de radiación ionizante de baja energía o bien una fuente de radiación ionizante de alta energía.

45 Los resultados anteriores demuestran la eficacia de las nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido, biocompatibles, con una densidad superior a 7 g/cm³ para inducir la muerte de las células (incluso de las células radorresistentes) que han sido irradiadas con una fuente de radiación de energía, en particular una fuente de radiación de energía alta.

Ejemplo 10:

Efecto de la densidad de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido, biocompatibles, sobre la viabilidad celular.

50 El ensayo WST-1 permite el cribado de la eficacia de las nanopartículas o agregados de nanopartículas basado en la viabilidad celular. Se ensayan aquí nanopartículas o agregados de nanopartículas inorgánicas biocompatibles de distintas densidades.

La viabilidad celular se mide después de un período de tratamiento de 24 horas, con nanopartículas (a 800 µM reduciendo hasta 3,125 µM) o sin nanopartículas, después de una dosis de irradiación fija (2 Gy) utilizando una

fuelle de 200 keV (Tubo Cometa MXR-225/22- 200 kV/15 mA/0,2 mm Cu), seguido por un período post incubación de 96 horas.

5 La viabilidad celular con nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido biocompatibles, se determina después de una irradiación de 2 Gy utilizando dichas nanopartículas o agregados de nanopartículas (400 μM) y una curva de ajuste (véase las figuras 12A a L).

10 Una disminución de la viabilidad celular superior al 20 % ($> 20\%$) a 400 μM cuando se compara con un tratamiento radioterapéutico sólo (sin nanopartículas) es considerada relevante. En efecto, cuando dichas nanopartículas o agregados de nanopartículas biocompatibles se utilizan en ensayos clonogénicos, permiten una relación de aumento de la radiación (ER) de 1,33 sobre las líneas celulares HCT116 y de 1,60 sobre las líneas celulares HT29 (véase el ejemplo 5).

15 Al contrario, una disminución de la viabilidad celular inferior o igual al 20 % ($\leq 20\%$) a 400 μM cuando se compara con un tratamiento radioterapéutico sólo (sin nanopartículas) es considerada como no relevante. En efecto, cuando dichas nanopartículas o agregados de nanopartículas biocompatibles se utilizan en ensayos clonogénicos, la irradiación casi no tiene ningún efecto significativo sobre ambas células cancerosas, las radiosensibles (HCT116) y las radorresistentes (HT29) (véase el ejemplo 4).

La descripción de métodos para preparar los diferentes óxidos ensayados, se registra en los puntos a) a d). Las nanopartículas comerciales se describen en el punto e). Los valores de densidad, de viabilidad celular a 400 μM (cuando se compara con un tratamiento radioterapéutico solo) y de eficiencia relativa a 800 μM , se detallan en las tablas que siguen (véase los puntos a) a e)).

20 Las figuras 12 presentan la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy utilizando nanopartículas o agregados de nanopartículas.

25 Como se ha explicado previamente, la figura 13 presenta la eficiencia relativa (capacidad para inducir la muerte celular), expresada como porcentaje. Dicha eficiencia relativa refleja la viabilidad celular (% de control) después de una irradiación de 2 Gy de las partículas ensayadas en el ejemplo 10, a 800 μM , cuando se compara con un tratamiento radioterapéutico solo (sin nanopartículas), con respecto a la viabilidad celular (% de control) de las nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 biocompatibles (véase el ejemplo 3) a 800 μM , cuando se compara con un tratamiento radioterapéutico solo (sin nanopartículas)

Los ensayos de eficiencia *in vitro* realizados en este estudio destacan la importancia de la densidad del óxido con un efecto umbral para $d \geq 7 \text{ g/cm}^3$ (véase la figura 13).

30 Se distinguen dos grupos de nanopartículas con diferencias significativas en términos de eficiencia:

- densidad $< 7 \text{ g/cm}^3$: la eficiencia relativa de las nanopartículas ensayadas es inferior a aproximadamente 55 %
- densidad $\geq 7 \text{ g/cm}^3$: la eficiencia relativa de las nanopartículas ensayadas es superior a aproximadamente 80 %.

a) Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de hafnio (HfO_2) con una densidad que varía de 6,7 hasta 8,3 g/cm^3 , utilizando hexametafosfato de sodio como agente de recubrimiento.

35 Se añade una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a 40 g de solución de HfCl_4 . Se realiza la adición de solución de TMAOH hasta que el pH de la suspensión final alcance el valor de pH deseado que se indica en la tabla 2.

Se obtiene un precipitado blanco.

40 Se transfiere después el precipitado a un autoclave y se calienta a una temperatura comprendida entre 120 °C y 300 °C para realizar la cristalización. Después de enfriar, se lava la suspensión con agua desionizada.

Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de las nanopartículas o agregados de nanopartículas.

45 A continuación, se añade la suspensión de hexametafosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de hexametafosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión para que esté comprendido entre aproximadamente 6,5 y 7,5.

Como se ve por la siguiente tabla 2 la densidad de las nanopartículas de HfO_2 se puede modular con un ajuste cuidadoso del pH de la suspensión inicial. Los datos relativos a la viabilidad de las células irradiadas expuestas a cada uno de los óxidos de la tabla 2, aparecen respectivamente en las figuras 12A, 12B y 12C.

Tabla 2:

Óxido	pH	Densidad	Viabilidad celular (% de control)	Eficiencia relativa observada
-------	----	----------	-----------------------------------	-------------------------------

			observada con una concentración de óxido 400 μM en comparación con un tratamiento radioterapéutico solo	con una concentración de óxido 800 μM
HfO ₂ Ref. Ejemplo 3		8,3	> 20 %	100 %
HfO ₂ -L	pH 7	7,4	39 % (HfO ₂ Ref.: 40 %)	97 %
HfO ₂ -E	pH 3	6,8	16 % (HfO ₂ Ref.: 35 %)	53 %
HfO ₂ -V	pH 2	6,7	9 % (HfO ₂ Ref.: 43 %)	30 %

b) Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de cerio (CeO₂) con una densidad que varía de 6,5 hasta 7,1, utilizando hexametáfosfato de sodio como agente de recubrimiento.

La síntesis de CeO₂ se adapta de Zhou & Al., Chem. Mater, 2003, 15, 378-382.

5 Se disuelve Ce(SO₄)₂·4H₂O en agua desionizada para obtener una solución 0,4 M. Se añade entonces solución de amoníaco gota a gota a temperatura ambiente con agitación continua. Se añade solución de amoníaco hasta alcanzar una relación de volumen final de solución de amoníaco con respecto a la solución de sulfato de cerio de 1:5. La suspensión resultante se lava entonces por centrifugación 4 veces con agua desionizada.

10 El sedimento final se suspende en agua desionizada para obtener las soluciones de los precursores de óxido de cerio, 0,05 M (CeO₂-1) o 0,2 M (CeO₂-2), ambas a pH 4. Las soluciones CeO₂-1 y CeO₂-2, se someten a tratamiento hidrotérmico a 180 °C durante 24 horas. Se lavan entonces las muestras 4 veces con agua desionizada por centrifugación. Cada muestra se seca finalmente a 105 °C y se somete a un tratamiento térmico. La muestra de CeO₂-1 se calcina a 700 °C durante 1 hora y la de CeO₂-2 a 900 °C durante 1 hora para obtener respectivamente las muestras CeO₂-S y CeO₂-W,

15 Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de nanopartículas o agregados de nanopartículas.

A continuación, se añade la suspensión de hexametáfosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de hexametáfosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión para que esté comprendido entre 6,5 y 7,5.

20 Como se ve por la siguiente tabla 3 la densidad de las nanopartículas de CeO₂ se puede modular con un ajuste cuidadoso tanto de la temperatura como de la duración del tratamiento térmico. Los datos relativos a la viabilidad de las células irradiadas expuestas a cada uno de los óxidos de la tabla 3, aparecen respectivamente en las figuras 12D y 12E.

Tabla 3:

Óxido	Temperatura y duración de la calcinación	Densidad	Viabilidad celular (% de control) observada con una concentración de óxido 400 μM en comparación con un tratamiento radioterapéutico solo	Eficiencia relativa observada con una concentración de óxido 800 μM
HfO ₂ Ref. Ejemplo 3		8,3	> 20 %	100 %
CeO ₂ -W	900 °C, 1 h	7,1	39 % (HfO ₂ Ref.: 48 %)	91 %
CeO ₂ -S	700 °C, 1 h	6,5	20 % (HfO ₂ Ref.: 35 %)	56 %

25 c) Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de tulio (Tm₂O₃) con una densidad que varía de 2,7 hasta 8,3 g/cm³.

Se disuelven 5 g de TmCl₃ en HCl 2 M. Se añade entonces solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a la solución de TmCl₃ hasta que el pH es 7 (Tm₂O₃-0) u 8 (Tm₂O₃-1). Se obtiene un precipitado blanco.

30 El precipitado se somete a tratamiento hidrotérmico en autoclave, esto es, se calienta a una temperatura entre 120 °C y 300 °C. La suspensión resultante se lava entonces por centrifugación con agua desionizada y se seca a 105 °C durante la noche.

Los polvos se someten a calcinación:

- Tm₂O₃: 400 °C, 1 h
- Tm₂O₃: 600 °C, 1 h

- Tm₂O₃: 800 °C, 5 min
- Tm₂O₃: 800 °C, 2 h

Como se ve por la siguiente tabla 4, la densidad de las nanopartículas de Tm₂O₃ se puede modular con un ajuste cuidadoso tanto de la temperatura como de la duración del tratamiento térmico.

5 Tabla 4:

Óxido	Temperatura y duración de la calcinación	Densidad
Tm ₂ O ₃	800 °C, 2 h	8,3
Tm ₂ O ₃	800 °C, 5 min	6,8
Tm ₂ O ₃	600 °C, 1 h	6,1
Tm ₂ O ₃	400 °C, 1 h	4,9
Tm ₂ O ₃ -1	Ninguna	2,7

d) Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂) con una densidad inferior a 7 g/cm³, utilizando hexametrafosfato de sodio como agente de recubrimiento.

10 Se añaden 15 mL de TiCl₄ gota a gota a 180 mL de solución de HCl 3 M con agitación suave. Se añaden después 120 mL de agua desionizada para tener un volumen final de 215 ml. El pH de la solución se ajusta progresivamente a 2 utilizando solución de NaOH 3 M. La solución se convierte en un precipitado blanco que se calienta a 60 °C durante 24 h. Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de nanopartículas o agregados de nanopartículas.

15 A continuación, se añade la suspensión de hexametrafosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de hexametrafosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión para que esté comprendido entre 6,5 y 7,5.

Los datos relativos a la viabilidad de las células irradiadas expuestas a óxido TiO₂ de la tabla 5, aparecen en las figuras 12F.

Tabla 5:

Óxido	Densidad	Viabilidad celular (% de control) observada con una concentración de óxido 400 μM en comparación con un tratamiento radioterapéutico solo	Eficiencia relativa observada con una concentración de óxido 800 μM
HfO ₂ Ref. Ejemplo 3	8,3	> 20 %	100 %
TiO ₂ _5 nm	3,9	11 % (HfO ₂ Ref.: 49 %)	48 %

20 e) Suspensión biocompatible de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido comercial con una densidad que varía de 3,8 hasta 7,9, utilizando hexametrafosfato de sodio como agente de recubrimiento.

Todas las nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido se obtienen como polvos comerciales (del más alto grado de pureza).

25 Se dispersan los polvos en solución acuosa y se someten a ultrasonidos para una dispersión eficiente en la solución. Se realiza una etapa de peptización, con el fin de obtener una suspensión estable de nanopartículas o agregados de nanopartículas.

30 A continuación, se añade la suspensión de hexametrafosfato de sodio a la solución peptizada (siendo la cantidad de hexametrafosfato de sodio añadida inferior a la LD50/5) y se ajusta el pH de la suspensión para que esté comprendido entre 6,5 y 7,5.

Los datos relativos a la viabilidad de las células irradiadas expuestas a cada uno de los óxidos de la tabla 6, aparecen respectivamente en las figuras 12G, 12H, 12I, 12J, 12K y 12L.

Tabla 6:

Óxido	Densidad	Viabilidad celular (% de control) observada con una concentración de óxido 400 µM en comparación con un tratamiento radioterapéutico solo	Eficiencia relativa observada con una concentración de óxido 800 µM
HfO ₂ Ref. Ejemplo 3	8,3	> 20 %	100 %
PdO-A	7,9	34 % (HfO ₂ Ref.: 48 %)	79 %
TiO ₂ -P25	3,8	12 % (HfO ₂ Ref.: 49 %)	< 25 %
CeO ₂ -D	6,6	12 % (HfO ₂ Ref.: 24 %)	42 %
Nd ₂ O ₃ -Z	5,4	< 10 % (HfO ₂ Ref.: 33 %)	< 25 %
Eu ₂ O ₃ -B	5,6	< 10 % (HfO ₂ Ref.: 21 %)	< 25 %
WO ₃ -C	7,2	40,5 % (HfO ₂ Ref.: 42 %)	95 %

Ejemplo 11:

5 Importancia de una cubierta superficial biocompatible para la estabilidad eficiente de una suspensión de nanopartículas o agregados de nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂), óxido de cerio (CeO₂) y óxido de hafnio (HfO₂), utilizando hexametáfosfato de sodio como agente de recubrimiento.

10 Para ser utilizadas *in vivo*, las nanopartículas o agregados de nanopartículas activables deben ser biocompatibles. La biocompatibilidad requiere alta estabilidad en medios fisiológicos (6,5 ≤ pH ≤ 7,5) para evitar la agregación en la circulación sanguínea y para permitir una distribución eficiente (efecto EPR). Por lo tanto, un pre-requisito antes de la inyección es comprobar la estabilidad de la suspensión de nanopartículas o agregados de nanopartículas en condiciones fisiológicas.

Se ha evaluado así la estabilidad de las partículas con o sin cubierta de HMP en agua y en glucosa (al 5 %). Se confirmó la estabilidad visualmente en los diferentes medios y por el rendimiento de la filtración utilizando un filtro de 0,22 µm.

Resultados: estabilidad

15 Se formulan en solución de glucosa (al 5 %), las suspensiones de nanopartículas (TiO₂-5 nm del ejemplo 10 d), CeO₂-D comercial del ejemplo 10 e) y HfO₂-Ref. del ejemplo 3) - suspensión peptizada a pH 3 o suspensión a pH 7 – sin HMP como agente de recubrimiento superficial biocompatible. Se formulan también suspensiones de nanopartículas a pH 7 con cubierta de HMP en solución de glucosa (al 5 %). La concentración de nanopartículas para cada suspensión es de aproximadamente 5 g/L. Se deja cada muestra 2 h y se realiza visualmente un primer análisis discriminatorio de la estabilidad de las nanopartículas en suspensión (figura 14).

20 La primera evaluación demuestra que todas las muestras no recubiertas permanecen estables a pH 3 en agua y en solución de glucosa (al 5 %) debido a la presencia de cargas positivas sobre la superficie de las partículas puesto que todas las partículas tienen un punto isoeléctrico (IEP) próximo a pH 6-7. Aumentando el pH de la suspensión (agua o glucosa) hasta 7, se observa la precipitación de nanopartículas, siendo el pH próximo al IEP. El recubrimiento de las partículas utilizando HMP aumenta notablemente la estabilidad a pH 7 en agua y en solución de glucosa (al 5 %).

Resultados: rendimiento de la filtración

30 Los filtros de corte a 0,22 µm permiten solamente el paso de nanopartículas o agregados de nanopartículas bien disociados. Incluso si sólo hay muy pocas agregaciones, las partículas se acumularán sobre el filtro y bloquearán rápidamente el filtro. La concentración de partículas se estimó mediante balance antes y después de la filtración.

Los datos presentados en la figura 15 demuestran el papel de la cubierta biocompatible que es absolutamente necesaria para mejorar las propiedades de superficie de la nanopartícula y para mejorar la estabilidad de las partículas en condiciones fisiológicas.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de nanopartículas o agregados de nanopartículas para la preparación de una composición farmacéutica para uso en un método de alteración o de destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas consiste en un óxido metálico seleccionado del grupo que consiste en CeO_2 , Tm_2O_3 , HfO_2 , WO_3 y PdO , en donde la densidad de dicha nanopartícula o la densidad de dicho agregado de nanopartículas es de al menos $7,1 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es CeO_2 , de al menos $8,3 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es Tm_2O_3 , de al menos $7,4 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es HfO_2 , de al menos $7,2 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es WO_3 , y de al menos $7,9 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es PdO , y en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas está cubierto con una cubierta biocompatible que permite la estabilidad de la nanopartícula o agregado de nanopartículas a pH entre 6,5 y 7,5 en un fluido fisiológico.
- 15 2. El uso según la reivindicación 1, en donde la cubierta biocompatible es una cubierta no biodegradable seleccionada del grupo que consiste en sílice, alúmina, azúcar, fosfato, silano, compuesto zwitteriónico, lípido, polímero carbonado saturado y un polímero inorgánico; o una cubierta biodegradable seleccionada del grupo que consiste en un polímero biológico, fosfolípido, sacárido, oligosacárido y polisacárido.
3. El uso según la reivindicación 2, en donde el óxido metálico se selecciona del grupo que consiste en CeO_2 , HfO_2 , WO_3 y PdO , y la cubierta biocompatible es hexametáfosfato de sodio (HMP).
4. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el óxido metálico es HfO_2 .
- 20 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en donde el óxido metálico es HfO_2 , y la cubierta biocompatible es trimetáfosfato de sodio (STMP) o hexametáfosfato de sodio (HMP).
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el tamaño de cada nanopartícula o agregado de nanopartículas está entre aproximadamente 10 y 200 nm.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dichas radiaciones ionizantes se seleccionan del grupo que consiste en rayos X, rayos gamma, haces de electrones y emisiones de radioisótopos.
- 25 8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las radiaciones ionizantes son de aproximadamente 2 keV a aproximadamente 25.000 keV.
9. El uso según la reivindicación 8, en donde las radiaciones ionizantes son de aproximadamente 2 keV a 6000 keV.
10. El uso según la reivindicación 8, en donde las radiaciones ionizantes son de aproximadamente 2 keV a 1500 keV.
- 30 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas es esencialmente de forma esférica.
12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las células diana se seleccionan del grupo que consiste en células benignas, células pre-malignas y células malignas.
- 35 13. El uso según la reivindicación 12, en donde dichas células malignas son células de un tumor seleccionado del grupo que consiste en un tumor hematológico y un tumor sólido.
14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición farmacéutica comprende además un compuesto terapéutico adicional, distinto de una nanopartícula o agregado de nanopartículas, destinado a tratar el cáncer.
15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho animal es un ser humano.
- 40 16. Nanopartícula o agregado de nanopartículas para uso en la alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas consiste en un óxido metálico seleccionado del grupo que consiste en CeO_2 , Tm_2O_3 , HfO_2 , WO_3 y PdO , en donde la densidad de dicha nanopartícula o la densidad de dicho agregado de nanopartículas es de al menos $7,1 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es CeO_2 , de al menos $8,3 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es Tm_2O_3 , de al menos $7,4 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es HfO_2 , de al menos $7,2 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es WO_3 , y de al menos $7,9 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es PdO , y en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas está cubierto con una cubierta biocompatible que permite la estabilidad de la nanopartícula o agregado de nanopartículas a pH entre 6,5 y 7,5 en un fluido fisiológico.
- 45 17. Nanopartícula o agregado de nanopartículas según la reivindicación 16, para uso en la detección o visualización y después en la alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes.
- 50

18. Nanopartícula o agregado de nanopartículas para uso según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en donde el óxido metálico es HfO_2 , y la cubierta biocompatible es trimetafosfato de sodio (STMP) o hexametafosfato de sodio (HMP).
- 5 19. Composición farmacéutica para uso en la alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde dicha composición farmacéutica comprende nanopartículas o agregado de nanopartículas y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas consiste en un óxido metálico seleccionado del grupo que consiste en CeO_2 , Tm_2O_3 , HfO_2 , WO_3 y PdO , en donde la densidad de dicha nanopartícula o la densidad de dicho agregado de nanopartículas es de al menos $7,1 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es CeO_2 , de al menos $8,3 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es Tm_2O_3 , de al menos $7,4 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es HfO_2 , de al menos $7,2 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es WO_3 , y de al menos $7,9 \text{ g/cm}^3$ cuando el óxido metálico es PdO , y en donde cada nanopartícula o agregado de nanopartículas está cubierto con una cubierta biocompatible que permite la estabilidad de la nanopartícula o agregado de nanopartículas a pH entre 6,5 y 7,5 en un fluido fisiológico.
- 10
- 15 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, para uso en la detección o visualización y después en la alteración o destrucción de células diana en un animal cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes.
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde el óxido metálico es HfO_2 , y la cubierta biocompatible es trimetafosfato de sodio (STMP) o hexametafosfato de sodio (HMP).

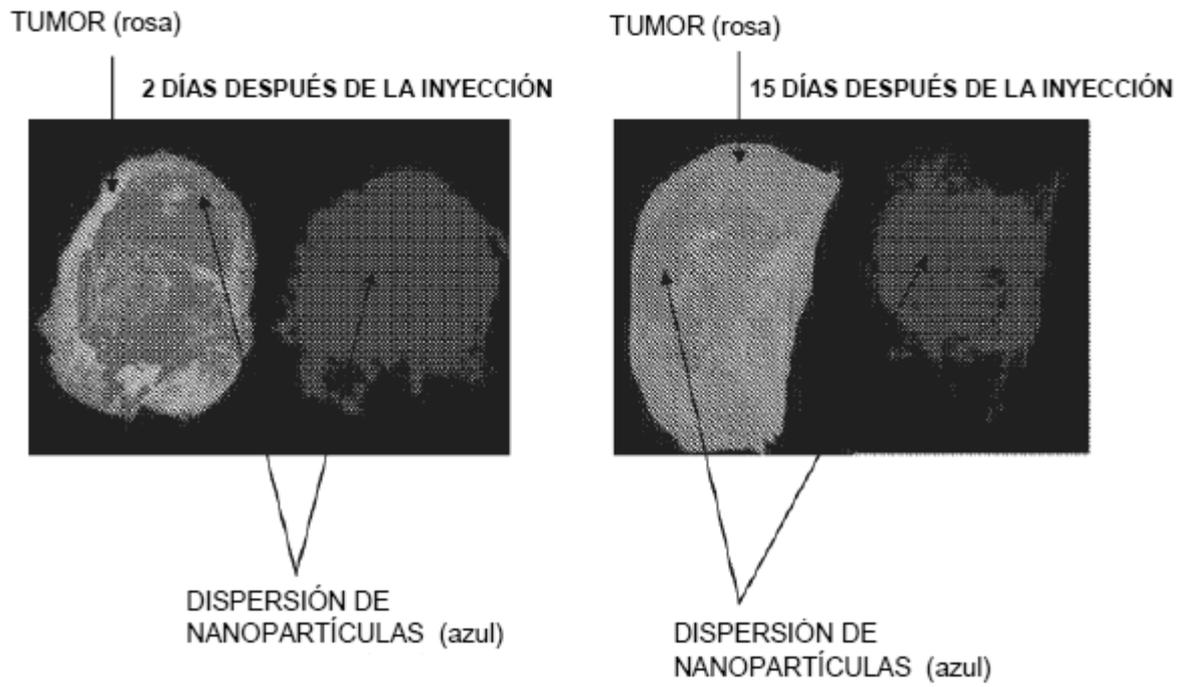
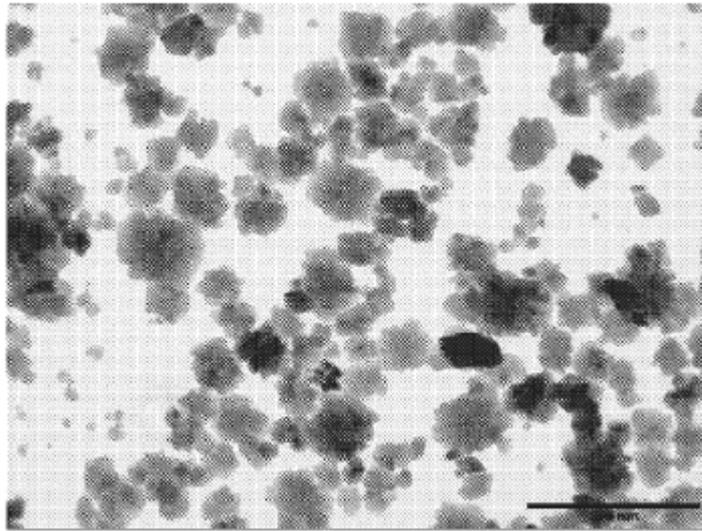


FIGURA 1

A)



B)

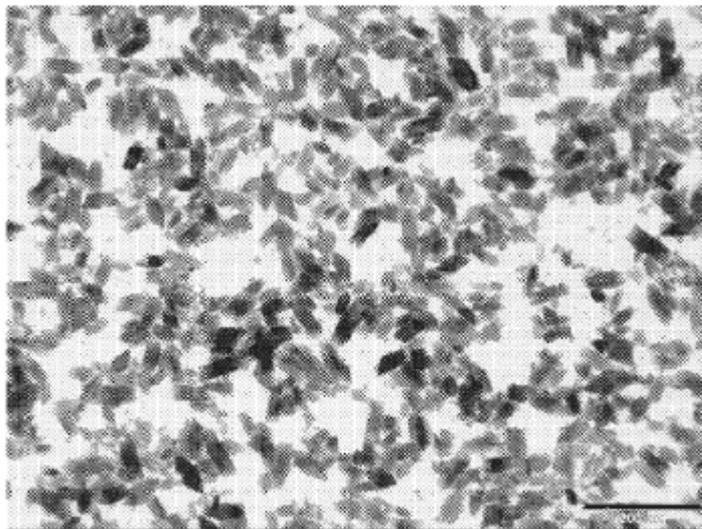


FIGURA 2

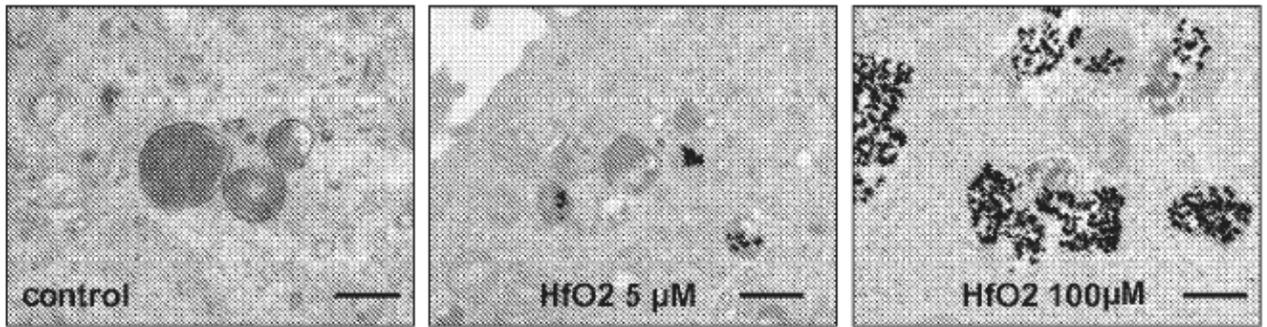


FIGURA 3

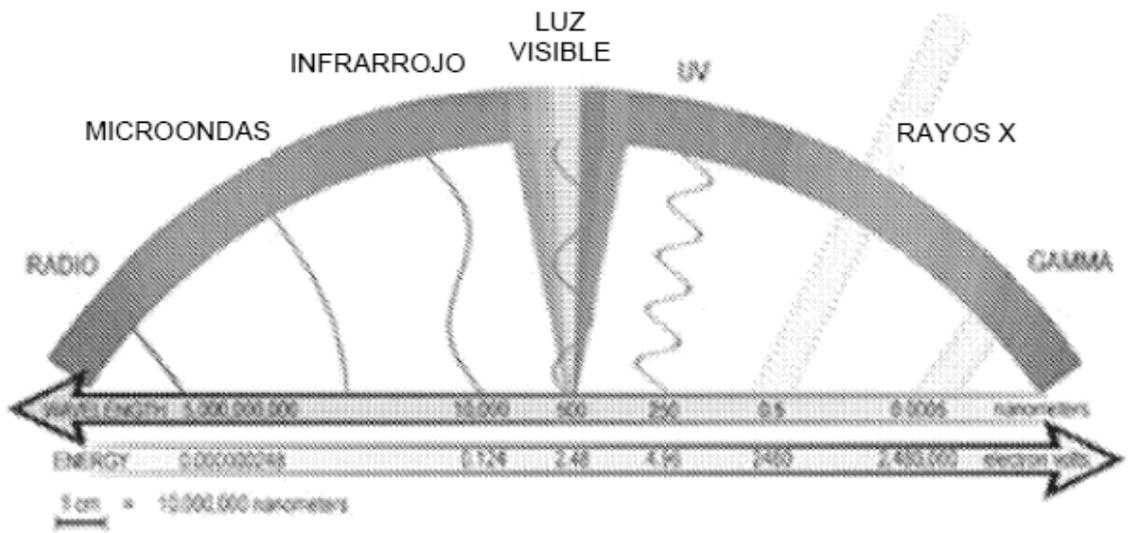


FIGURA 4

Valor del nivel de gris de las suspensiones biocompatibles de nanopartículas o agregados de nanopartículas de HfO_2 con diferente densidad como una función de su concentración

Valor de nivel de gris

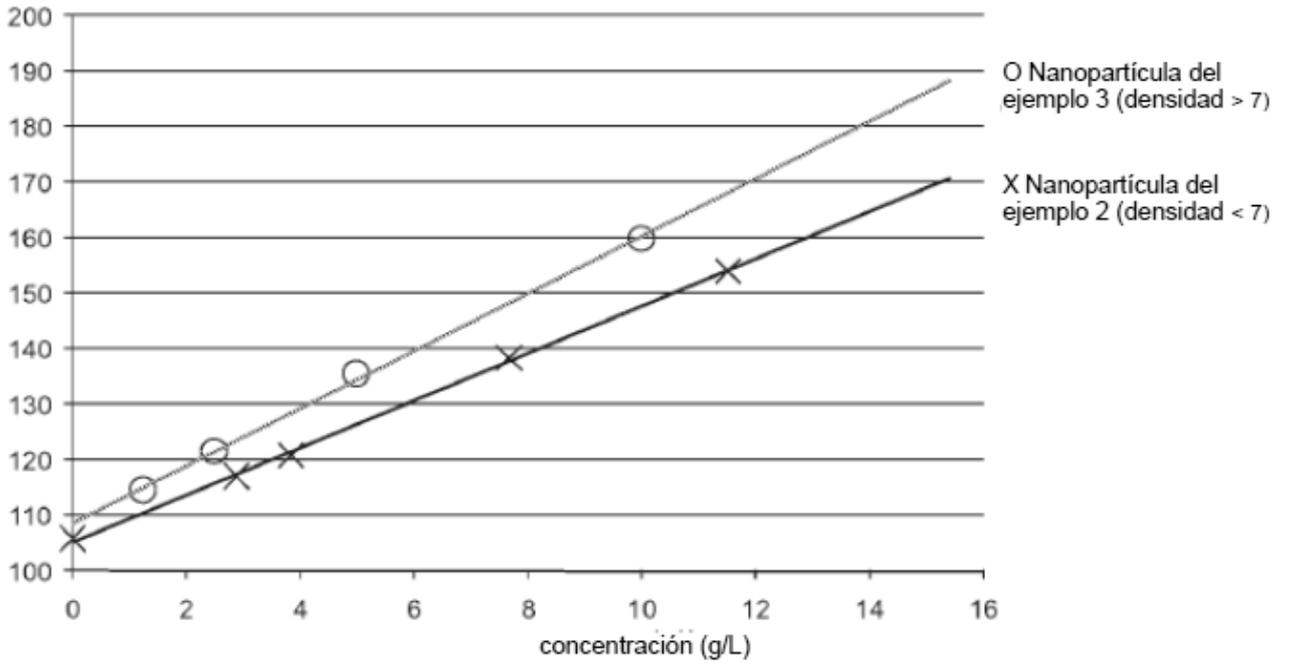


FIGURA 5 A

	Densidad	Producto	HCT116 SF2 (%)	HCT29 SF4 (%)
Control negativo (H_2O)			18	11
HfO_2 (ejemplo 2)	< 7	400 μM	18	8
HfO_2 (ejemplo 1)	> 7	400 μM	12	3,5

FIGURA 5B

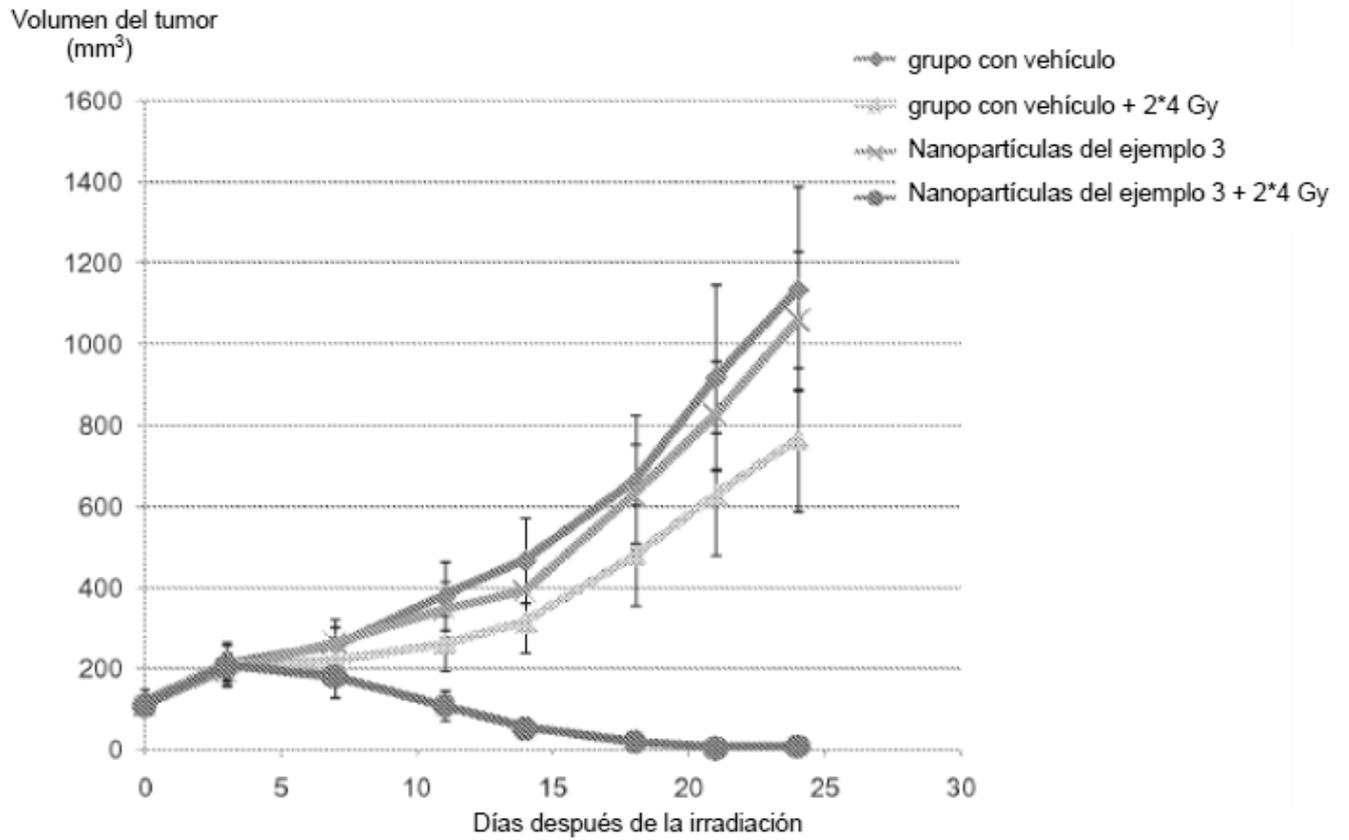


FIGURA 6

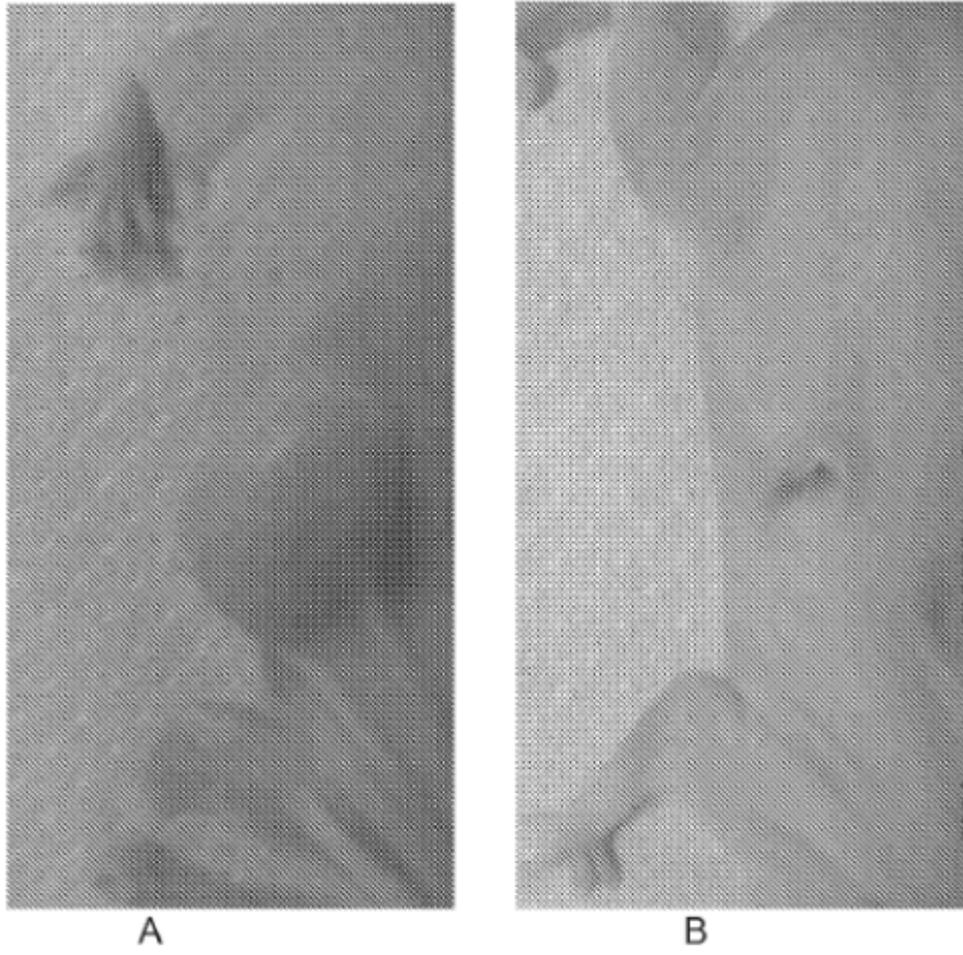


FIGURA 7

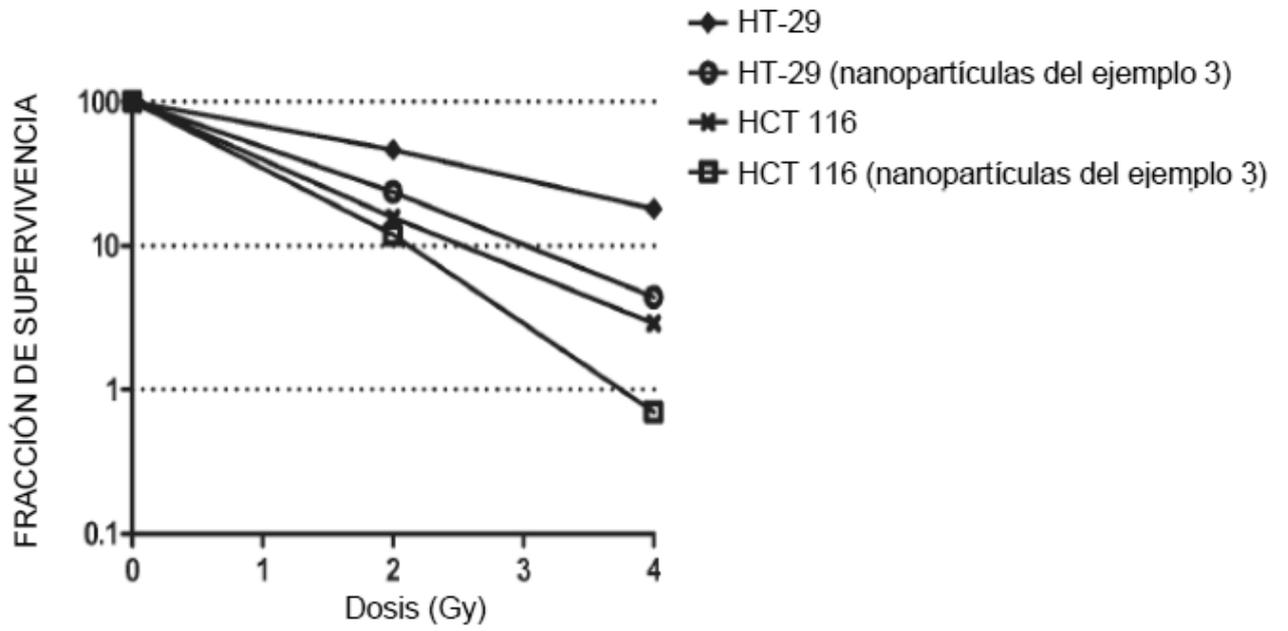


FIGURA 8

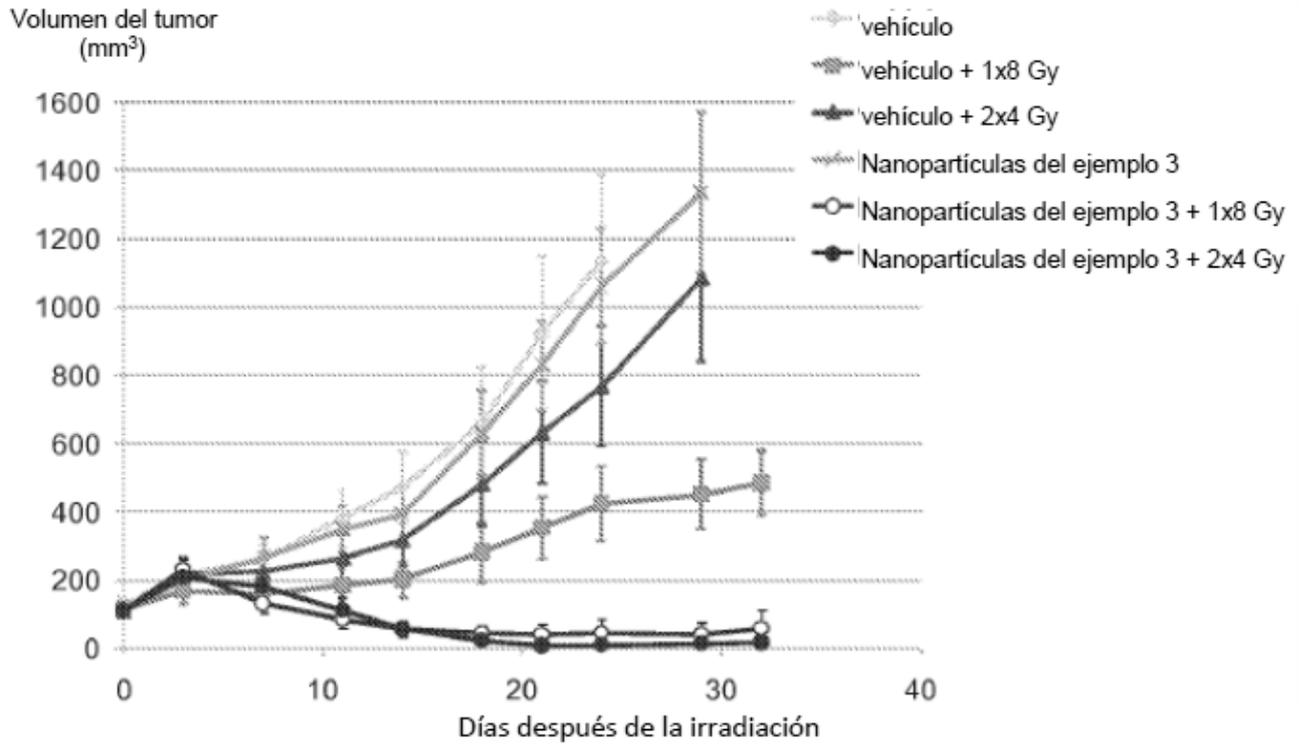


FIGURA 9

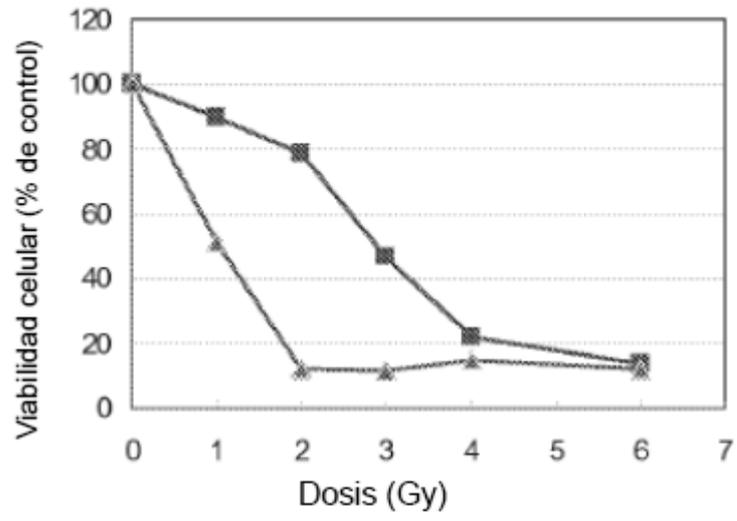


FIGURA 10

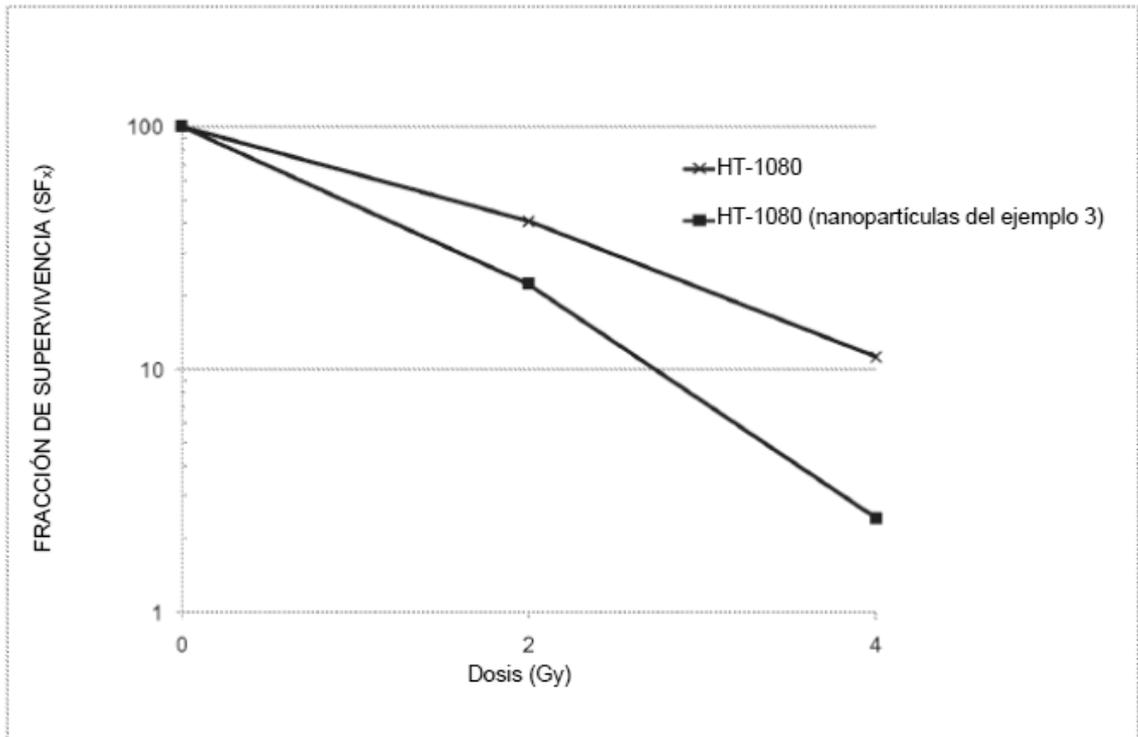


FIGURA 11A

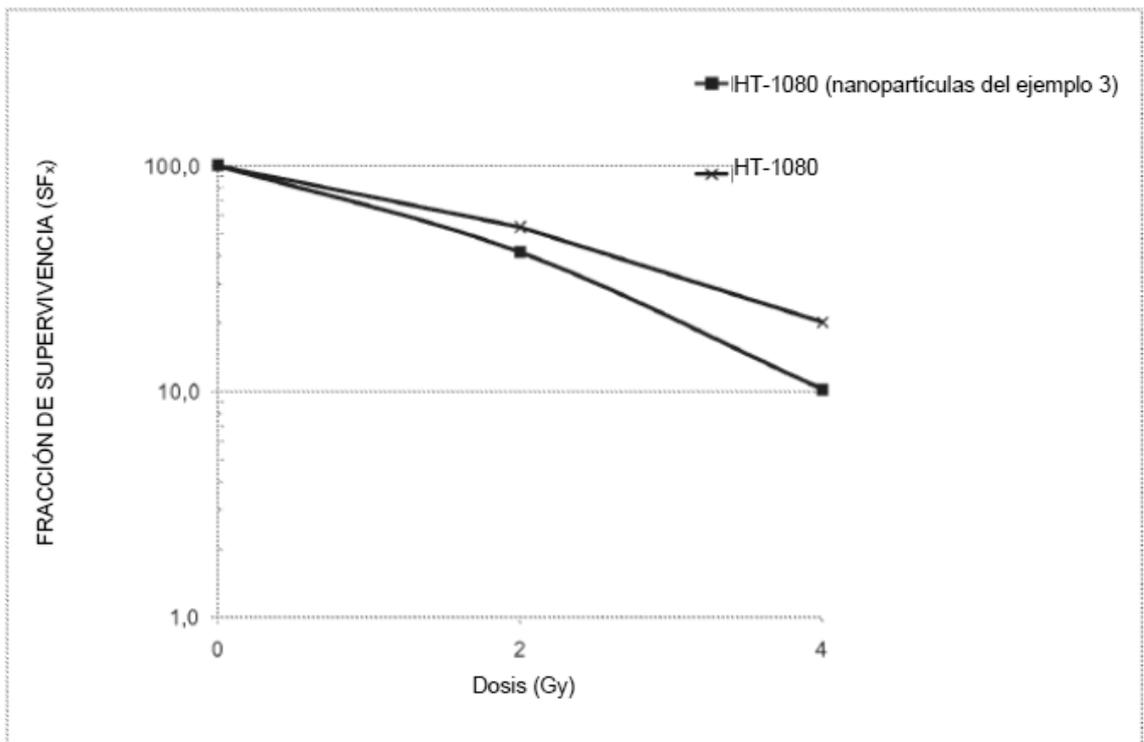


FIGURA 11B

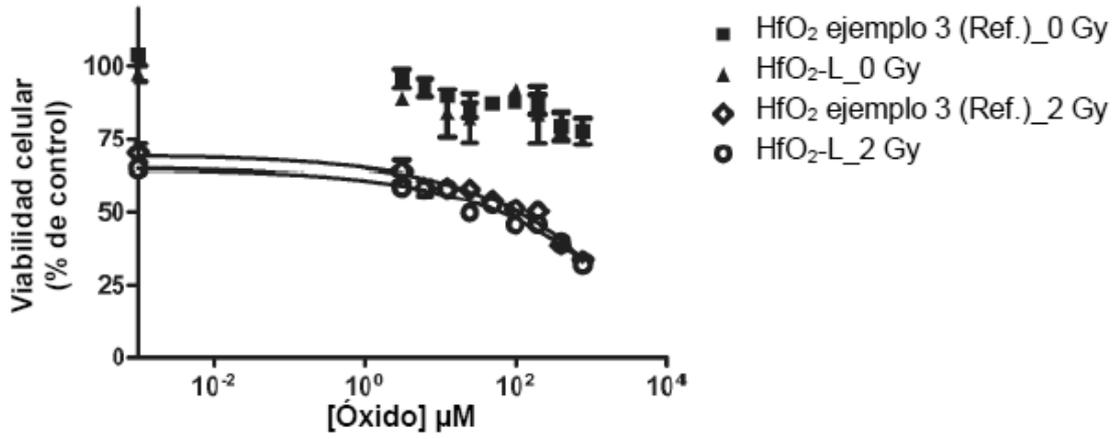


FIGURA 12A

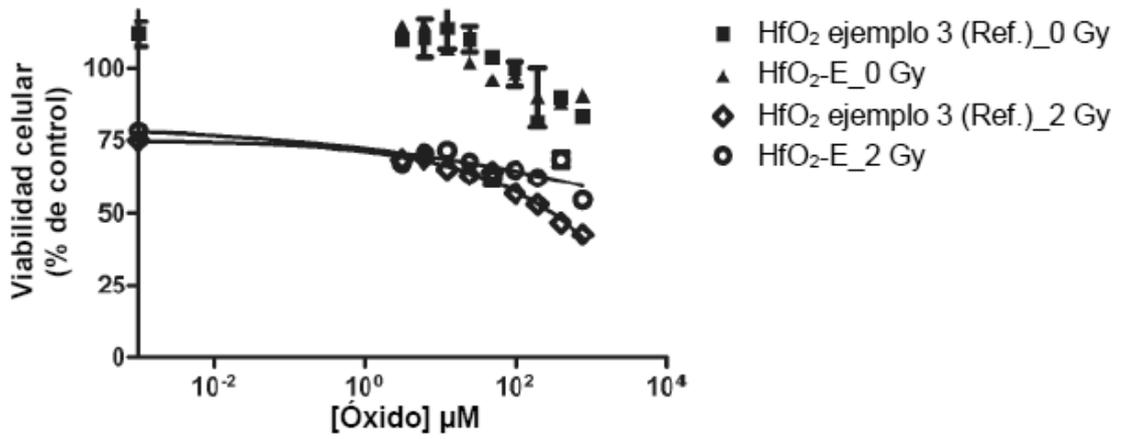


FIGURA 12B

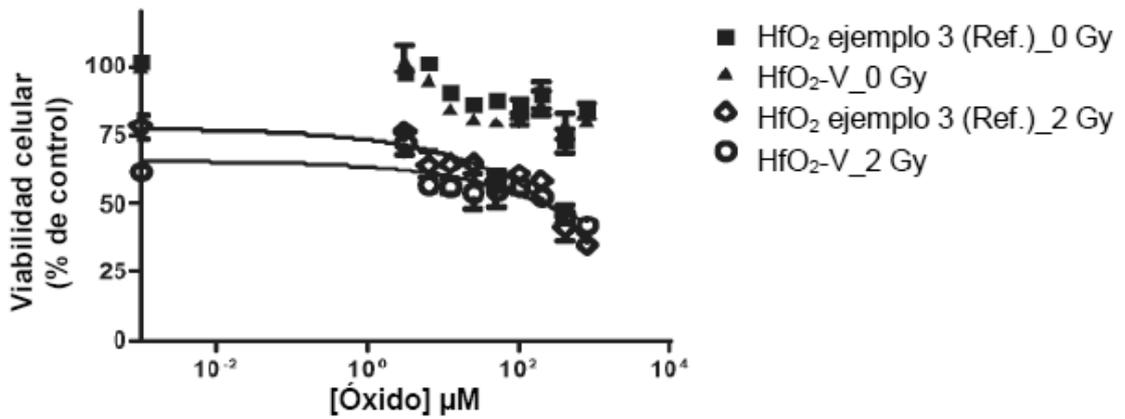


FIGURA 12C

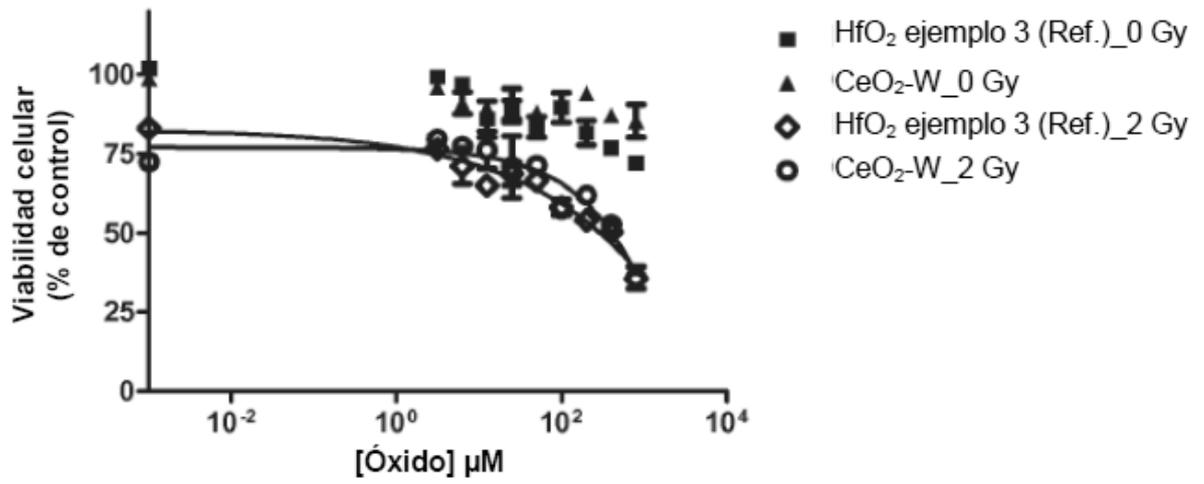


FIGURA 12D

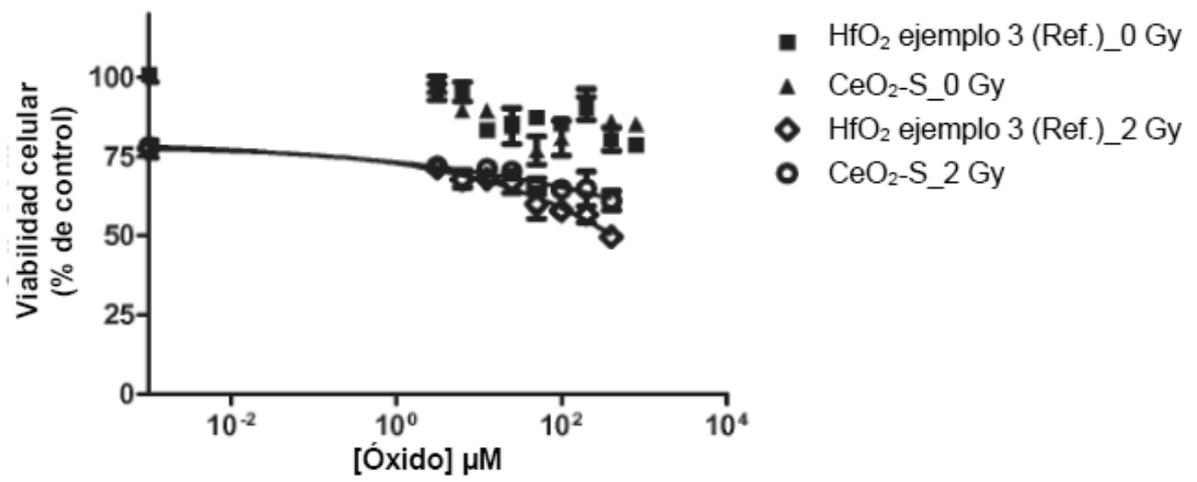


FIGURA 12E

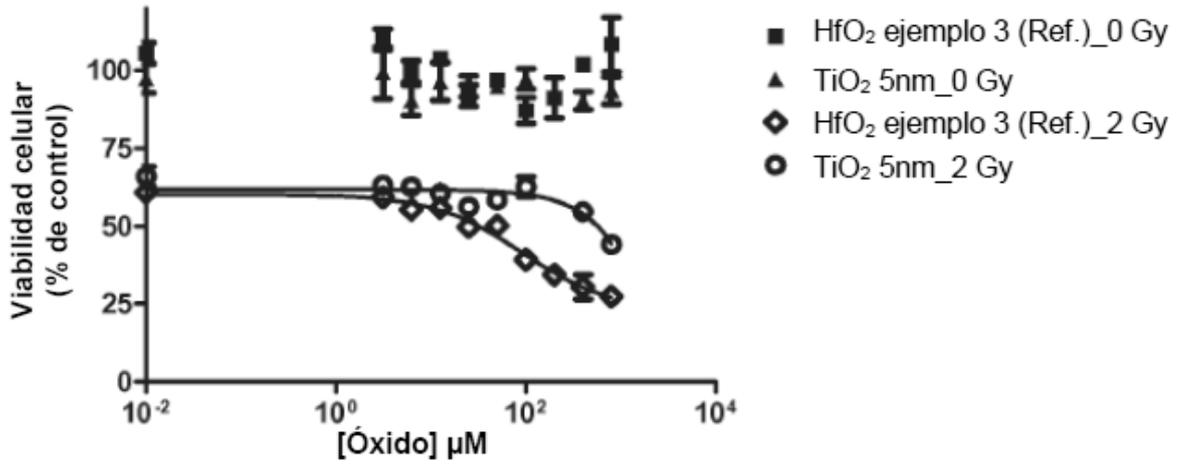


FIGURA 12F

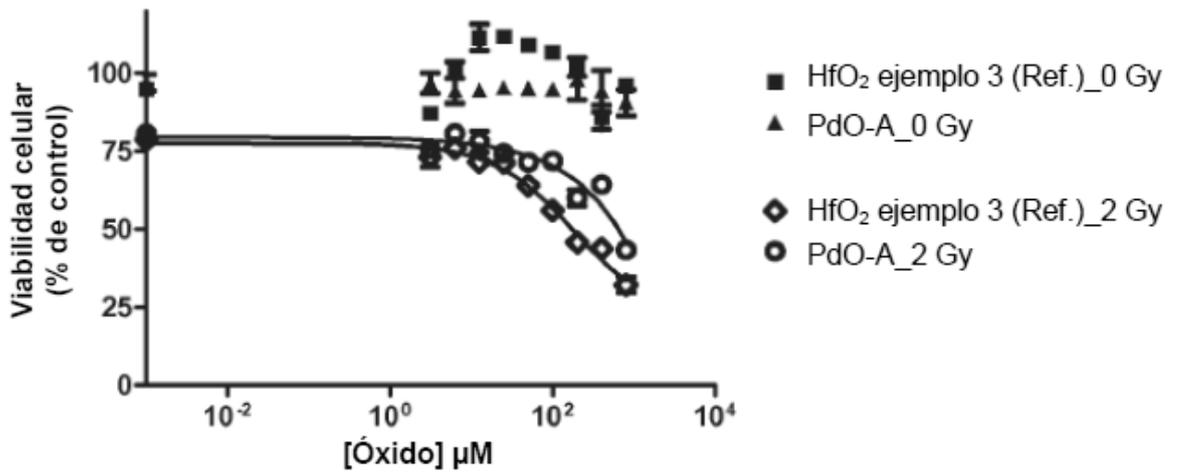


FIGURA 12G

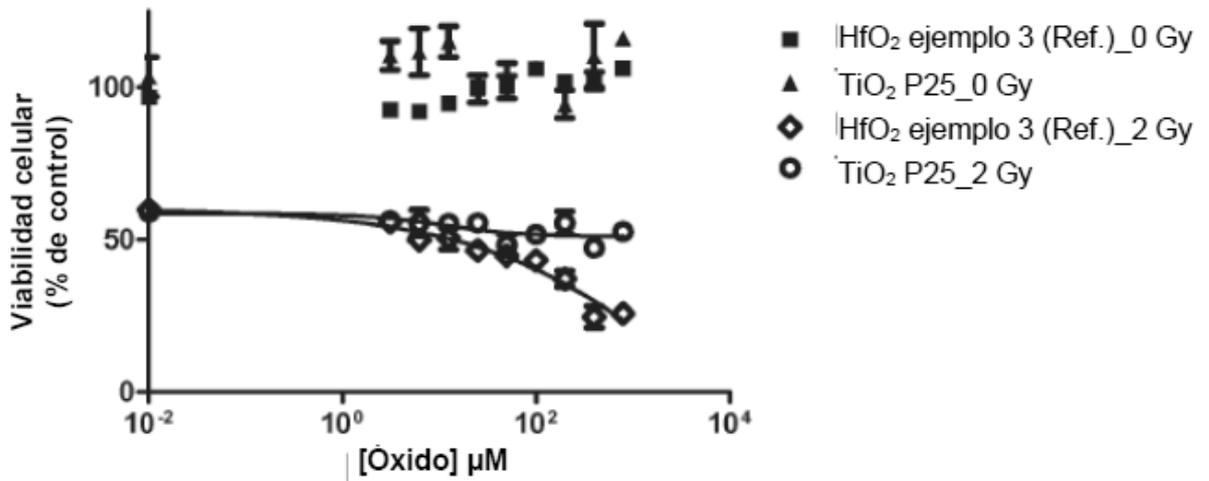


FIGURA 12H

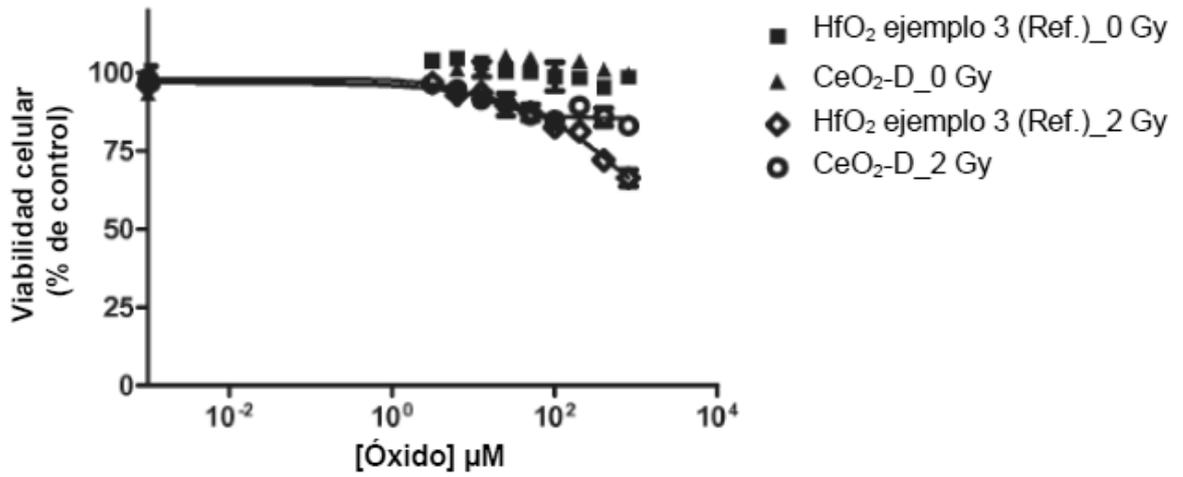


FIGURA 12I

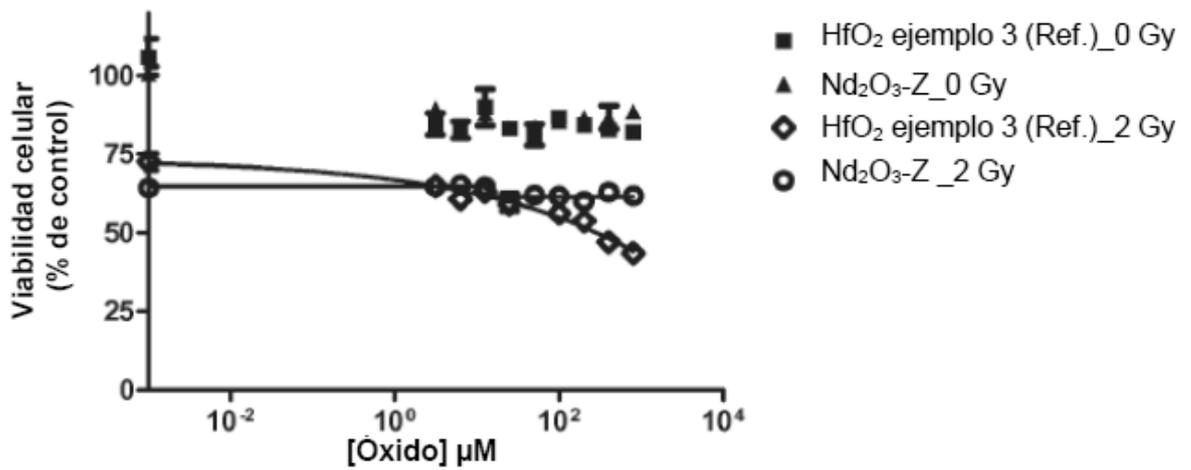


FIGURA 12J

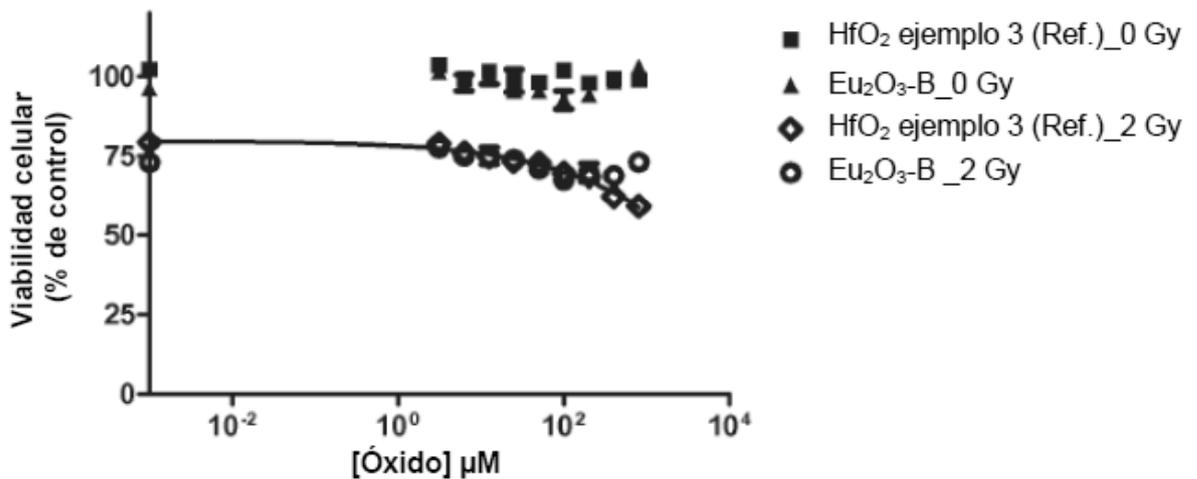


FIGURA 12K

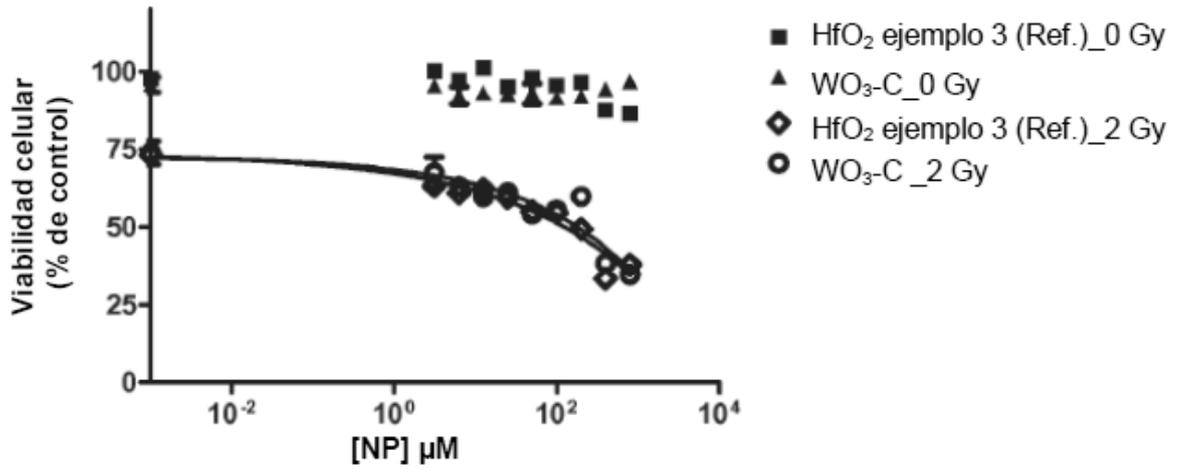


FIGURA 12L

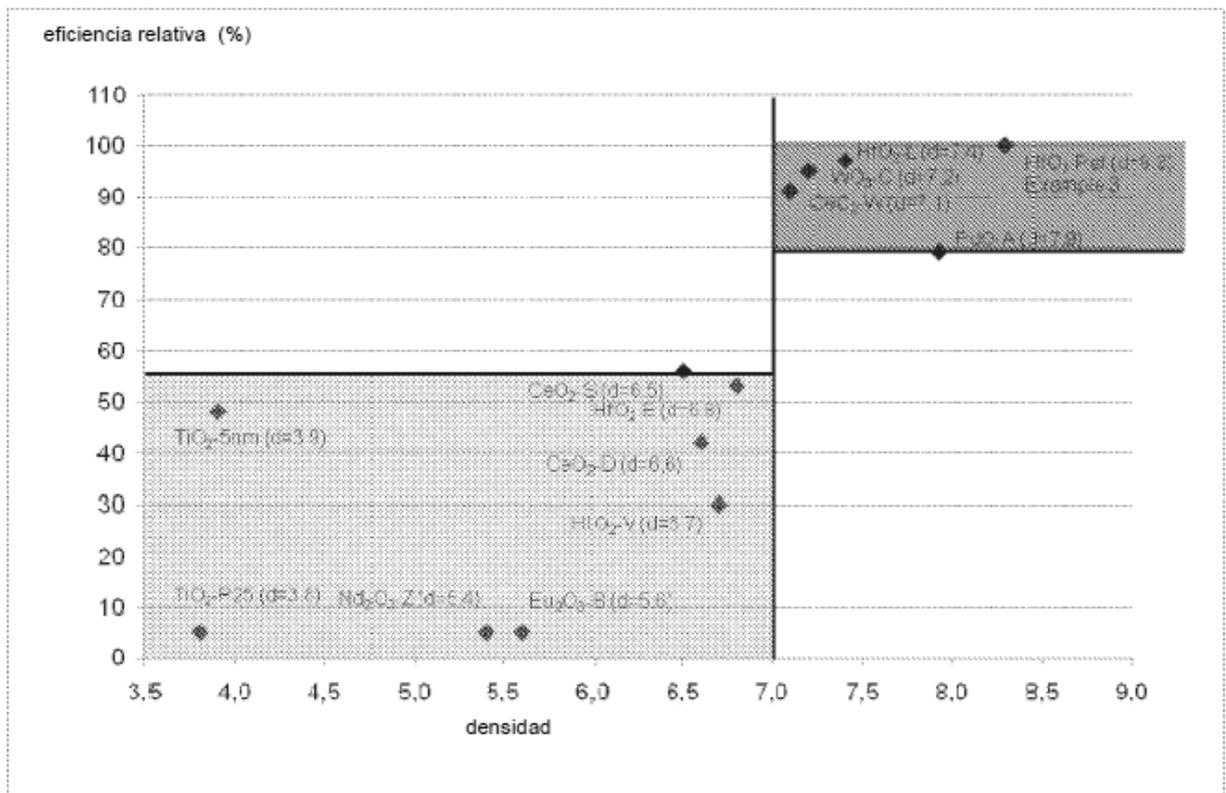


FIGURA 13

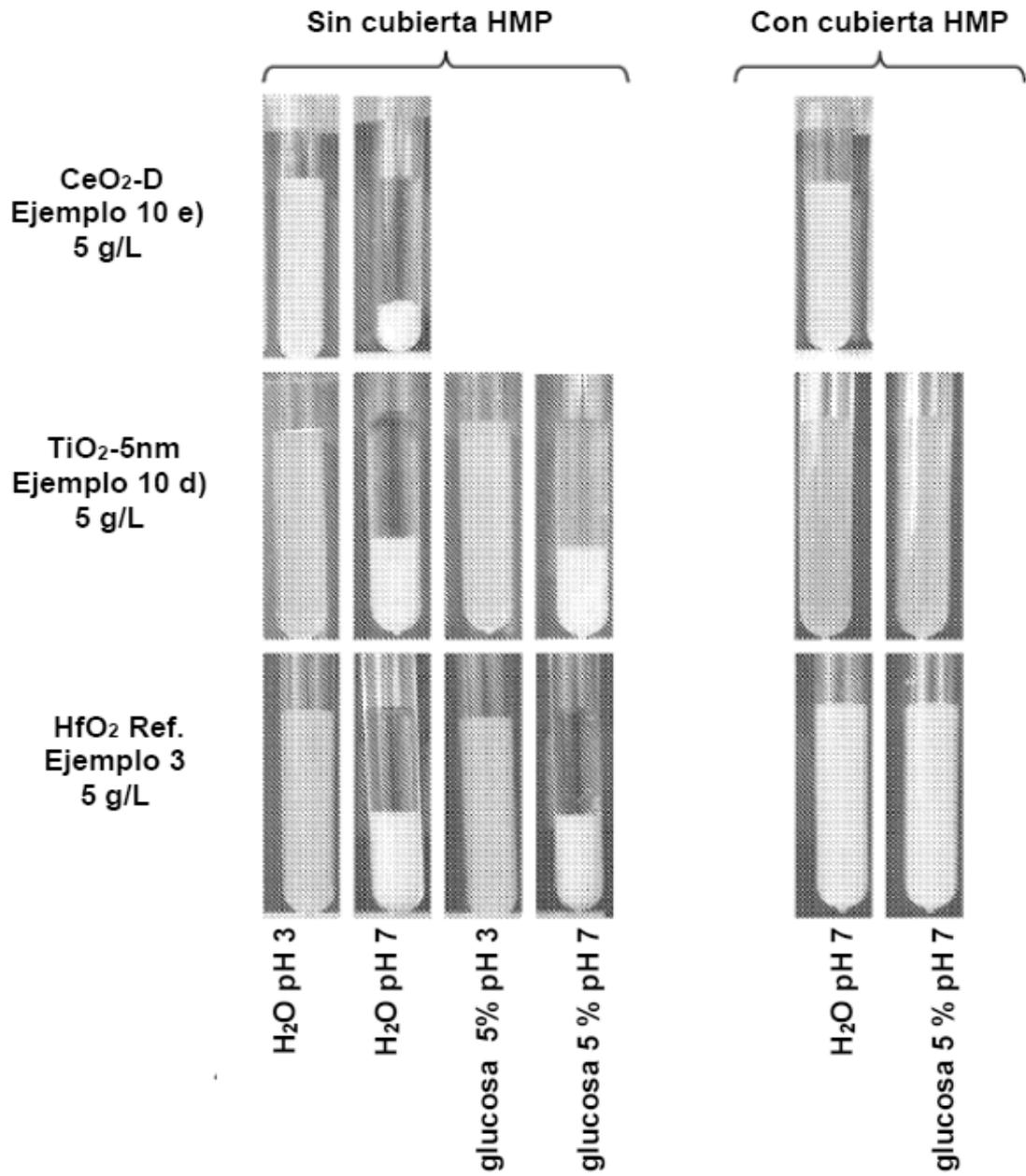


FIGURA 14

Muestra	Sin cubierta de HMP			Con cubierta de HMP		
	Antes de filtración (concentración en g/L)	Después de filtración (concentración en g/L)	Rendimiento de filtración (%)	Antes de filtración (concentración en g/L)	Después de filtración (concentración en g/L)	Rendimiento de filtración (%)
CeO ₂ -D ejemplo 10 e) H ₂ O pH 7	5,3	0	0	5,3	5,1	96
TiO ₂ -5nm ejemplo 10 d) H ₂ O pH 7	6,7	0	0	6,7	6,7	100
TiO ₂ -5nm ejemplo 10 d) Glucosa 5 % pH 7	4,5	0	0	4,5	4,4	98
HfO ₂ -Ref. ejemplo 3 H ₂ O pH 7	5,7	0	0	5,7	5,7	100
HfO ₂ -Ref. ejemplo 3 Glucosa 5 % pH 7	5,7	0	0	5,7	5,6	98

FIGURA 15