

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 628**

51 Int. Cl.:

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: **09.07.2010 PCT/EP2010/059871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO2011003999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10729917 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2451481**

54 Título: **Nanopartículas metálicas, preparación y usos de las mismas**

30 Prioridad:

10.07.2009 EP 09165157

10.07.2009 US 224576 P

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

13.06.2017

73 Titular/es:

NANOBIOTIX (100.0%)

60 rue de Wattignies

750012 Paris, FR

72 Inventor/es:

LEVY, LAURENT;

POTTIER, AGNÈS;

POUL, LAURENCE y

MAGGIORELLA, LAURENCE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 616 628 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 metálicas, preparación y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a nanopartículas activables que se pueden utilizar en el sector de la salud, en particular en la salud humana, para modificar, alterar o destruir células, tejidos u órganos diana. Más particularmente se refiere a nanopartículas que pueden generar un efecto terapéutico sorprendentemente eficaz, cuando se exponen a radiaciones ionizantes tales como Rayos-X, Rayos- γ , isótopos radiactivos y/o rayos de electrones. La nanopartícula es una partícula metálica que tiene, como tamaño más grande, un tamaño comprendido entre aproximadamente 80 y aproximadamente 105 nm, teniendo el metal preferiblemente un número atómico (Z) de al menos 25. La descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una población de nanopartículas como se define anteriormente, así como sus usos.

Antecedentes

15 Se han utilizado radiaciones de distintas formas tales como Rayos-X, Rayos-gamma, Rayos-UV, rayo láser, microondas, rayos de electrones, así como rayos de partículas de, por ejemplo, neutrones y protones, para tratar problemas relacionados con el cáncer. Algunas de dichas radiaciones se han utilizado en tales aplicaciones, en combinación con moléculas sensibles a la radiación. Las radiaciones electromagnéticas e ionizantes son, de hecho, capaces de romper en particular la molécula de ADN de la célula, matando así células y/o previniendo que dicha célula crezca y se divida. Este efecto es debido principalmente a los daños indirectos creados por los electrones en particular y/o los protones de alta energía emitidos después de la ionización que serán responsables de la generación de radicales libres.

20 Los términos "radiaciones ionizantes" se refieren a partículas u ondas altamente-energéticas que pueden ionizar un átomo o molécula. La capacidad ionizante depende de la energía de las partículas u ondas individuales, y no de su número. Un gran número de partículas u ondas no causarán ionización, en las situaciones más comunes, si las partículas u ondas individuales son insuficientemente energéticas. Una radiación ionizante típica es una radiación, cuya energía es mayor de 2 KeV.

25 La radiosensibilización mediante nanopartículas de oro (de sus siglas en inglés, GNPs) se ha identificado como un enfoque prometedor para mejorar la radioterapia.

30 US 6.955.639 (Hainfeld et al.) describe un método de mejora de los efectos de la radiación de Rayos-X utilizando un metal, en particular nanopartículas de oro, siendo el tamaño (diámetro) del núcleo del metal preferiblemente, por razones de distribución, del intervalo de 0,8 a 20 nm, más preferiblemente de 0,8 a 3 nm.

Herold et al. (Int. J. Rad. Biol. 76 (2000) 1357) indican que las nanopartículas de oro de pequeño tamaño (~ 2 nm) deberían difundir más homogéneamente a través de la masa tumoral. Chithrani et al. (Nano Lett. 6 (2006) 662; Nano Lett 7 (2007) 1542) mostraron una penetración y acumulación preferencial de GNPs de 50 nm de diámetro en células Hela.

35 Chang et al (Cancer Sci. 99 (2008) 1479) mostraron que, en un modelo de ratón portador de un tumor tipo melanoma, GNPs de 13-nm de diámetro junto con una dosis única de 25 Gy a partir de rayos de electrones de 6 MeV conducen a una reducción más pronunciada del volumen del tumor que en los grupos control.

40 Zhang et al. (Biomed Microdevices (2009), 11:925-933) proporcionan datos *in silico* (modelo de simulación Monte Carlo) que confirman que las nanopartículas de oro pueden mejorar la dosis eficaz de radiación, pero no estudia el impacto del tamaño de las nanopartículas en tal intensificación de la dosis. Este documento se refiere al diámetro de 1,9 nm de las partículas de Hainfeld en el contexto de la terapia de radiación (véase la página 930, columna derecha), pero no proporciona el resultado que podría ser de ayuda para cuantificar con exactitud un factor de intensificación de la dosis en un sistema biológico (véase Montenegro et al., J. Phys. Chem. A. 2009, 113, 12364-12369: "*Monte Carlo Simulations and Atomic Calculations for Auger Processes in Biomedical Nanotheranostics*"), en particular en un ser humano.

45 Los inventores de la presente memoria proporcionan nanopartículas potentes, que sorprendentemente son capaces de alcanzar una perturbación, alteración o destrucción más eficaz de las células diana *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, cuando dichas nanopartículas se exponen a radiaciones ionizantes, que las nanopartículas descritas en la técnica anterior, como se demuestra en la presente memoria.

50 La nanopartícula descrita en la presente memoria es una partícula metálica que tiene ventajas, como el mayor tamaño, un tamaño comprendido entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 105 nm, estando la nanopartícula fabricada de un metal que tiene preferiblemente un número atómico (Z) de al menos 25. Las propiedades ventajosas de las nanopartículas descritas en la presente memoria no se podrían extrapolar a partir de la técnica que, en contradicción con la presente invención, sugiere la utilización de nanopartículas de oro de pequeño tamaño para incrementar el factor de intensificación de la dosis [véase en particular Brun et al. (Colloids

and Surfaces B: interfaces, 72 (2009) 128-134: "*Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization*") que revela la influencia de la concentración de la nanopartícula de oro]. Los resultados aparecen en la Figura 4(B) de Brun et al. En particular, revela un incremento del factor de intensificación de la dosis cuando el tamaño de la nanopartícula de oro desciende, para una concentración de oro dada (el contenido de oro varía con el radio de la nanopartícula de oro según a un factor 3).

Para una concentración de un metal dado y una capacidad de absorción de radiación ionizante dada, se describen las nanopartículas metálicas en la presente memoria, estando el tamaño de una nanopartícula metálica típica preferiblemente entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 105 nm, son responsables de un aumento de la eficacia terapéutica (capacidad para generar daños en las células diana) cuando se comparan con tamaños menores de las nanopartículas, en particular cuando se comparan con nanopartículas que tienen un tamaño de 60 nm o menos.

Las nanopartículas metálicas que se describen en la presente memoria muestran una capacidad más fuerte para matar células y/o prevenir su división, para una concentración metálica y una atenuación de Rayos-X equivalente a nivel celular.

Otra característica mostrada por las nanopartículas que se describen en la presente memoria, es su capacidad, cuando se exponen a radiaciones ionizantes, para generar un efecto terapéutico cuando entran en contacto con las células diana. En otras palabras, la eficacia terapéutica observada bajo radiación no requiere de la captación celular de las nanopartículas. Tal propiedad se describe en la presente memoria por primera vez.

De hecho, hasta ahora, se creía que en la técnica se requería de la captación celular de la célula diana, para que las nanopartículas fueran capaces de generar en las células daños letales eficaces bajo radiación (véase por ejemplo Kong et al (Small 4 (2008) 1537)).

Por tanto, la presente invención va en contra de toda la técnica anterior conduciendo a la persona experta en la técnica a la utilización, principalmente por razones de biodisponibilidad, biodistribución, y captación celular, en términos de aplicaciones médicas, de nanopartículas con un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nm, como máximo 60 nm, con un particular interés de duración para las nanopartículas de 50-nm (véase por ejemplo Chithrani et al. (2006) y Chang et al (2008)).

Las nanopartículas que se describen en la presente memoria permiten además una reducción ventajosa en la cantidad de metal que se administra a un sujeto, así como una reducción en el número de etapas de administración de las nanopartículas, hasta un mínimo, en el contexto de un protocolo de tratamiento radioterapéutico completo, favoreciendo así su tolerancia por el sujeto.

Compendio de la invención

Los inventores han descubierto que es posible modificar, alterar o destruir células, tejidos u órganos diana, en particular en células o tejidos anormales, que se definen en la presente memoria como células o tejidos benignos, o células o tejidos enfermos, tales como células pre-malignas o malignas (células cancerosas) o tejidos (tumores), superficiales o profundas en el cuerpo, con una sorprendente eficacia aumentada, utilizando una nanopartícula fabricada de un metal que tiene preferiblemente un número atómico (Z) de al menos 25, normalmente de una nanopartícula de oro, estando el tamaño más grande de dicha nanopartícula comprendido entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 105 nm.

Las nanopartículas de la presente invención son nanopartículas de oro con un tamaño medio mayor entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 105 nm como se refiere en las reivindicaciones.

Es una ventaja de la presente invención proporcionar nanopartículas que no son nocivas por sí mismas pero que se pueden emplear con seguridad, en condiciones apropiadas, para modificar funcionalmente, alterar o destruir células diana en un animal, preferiblemente en un mamífero, incluso más preferiblemente en un ser humano. El efecto terapéutico deseado de las nanopartículas es, de hecho, estrictamente dependiente de su ionización, siendo dicha ionización generada por una fuente de radiación ionizante que se controla por sí misma ventajosamente, en términos de calidad y cantidad, y utilizada de una forma dirigida, por ejemplo, localizada, por el experto en la técnica.

La presente invención describe de hecho, las nanopartículas que pueden inducir a la modificación, alteración o destrucción celular *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, cuando dicha célula se expone a radiaciones ionizantes tales como en particular Rayos-X, rayos-gamma (Rayos-γ), isótopos radiactivos, rayos iónicos y/o rayos electrónicos.

Las nanopartículas que se describen en la presente memoria son capaces de interactuar directamente con radiaciones entrantes y generar un efecto terapéutico sorprendentemente eficaz, sin ser necesario para las nanopartículas estar internalizadas por las células diana.

Las nanopartículas que se describen en la presente memoria se pueden recubrir con un recubrimiento biocompatible preferiblemente que proteja la estabilidad de la nanopartícula en un fluido fisiológico como se describe además en la presente memoria más abajo.

Las presentes nanopartículas se pueden utilizar, si es apropiado y se prefiere, de una manera dirigida utilizando por ejemplo un componente de superficie que permita dirigirse específicamente a tejidos o células biológicas. Sin embargo, no requieren de una molécula que se dirija a concentrarse en células o tejidos diana.

5 El efecto de Permeación y Retención Mejorada ("EPR") es de hecho responsable de la acumulación pasiva en la masa tumoral, tras un tiempo dado después de una inyección mediante vía intravenosa (una posible vía de administración) de las nanopartículas. Se ha observado, de hecho, que los vasos del tumor son bastante distintos de los capilares normales y su "filtración" vascular estimula la extravasación selectiva de nanopartículas que no es usual en tejidos normales. La ausencia de un drenaje linfático eficaz en el tumor previene de la liberación de las nanopartículas penetrantes y promueve su acumulación. Las presentes nanopartículas son, por tanto, capaces de
10 dirigirse exitosamente al objetivo primario así como a tumores metastásicos después de la administración intravenosa.

Las presentes nanopartículas se pueden administrar también ventajosamente a través de una ruta intratumoral, o intra-arterial.

15 Por lo tanto, es un objetivo que se describe en la presente memoria utilizar una nanopartícula como se describe en la presente memoria o una población de tales nanopartículas para alterar o destruir una célula, tejido u órgano diana.

Aspectos particulares que se describen en la presente memoria se refieren a la utilización de una población de nanopartículas metálicas para preparar una composición farmacéutica destinada a modificar, alterar o destruir células diana de mamíferos cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde las nanopartículas se fabrican de un metal que tiene un número atómico (Z) de al menos 25 y el tamaño medio más grande de las
20 nanopartículas de la población está entre aproximadamente 80 y 105 nm, y para los métodos correspondientes del tratamiento.

En la presente memoria se divulgan en particular los productos según la presente descripción, en particular nanopartículas y población de nanopartículas metálicas, para utilizar en el tratamiento del cáncer.

25 Otro aspecto que se divulga en la presente invención está basado en una composición farmacéutica, en particular, como será evidente en toda la descripción, una composición farmacéutica destinada a modificar, alterar o destruir células diana en mamíferos cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, comprendiendo dicha composición farmacéutica una población de nanopartículas metálicas, como se define en la presente memoria, y un vehículo o excipiente aceptable farmacéuticamente, en donde las nanopartículas se fabrican de un metal que tiene un número atómico (Z) de al menos 25 y el tamaño medio más grande de las nanopartículas de la población está
30 entre aproximadamente 80 y 105 nm.

Otro aspecto que se divulga en la presente invención se refiere a la utilización de una nanopartícula, una población o composición de nanopartículas metálicas 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 dicho animal se expone a radiaciones, en particular radiaciones ionizantes como se define en la presente memoria.

35 La presente divulgación en particular engloba 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 al sujeto de una nanopartícula metálica, una población de nanopartículas metálicas como se describe en la presente memoria o una composición que comprende una población de tales nanopartículas, y exponiendo a dicho sujeto a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits que comprenden cualquier o más productos que se describen en la presente memoria, por ejemplo, nanopartículas y composiciones, junto con una etiqueta que proporciona instrucciones para utilizar el producto o productos.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A y 1B:

45 La Figura 1A muestra imágenes de la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, de sus siglas en inglés) de las nanopartículas de oro que se describen en la Tabla 1 (véase el ejemplo 1).

La Figura 1B muestra la distribución del tamaño de las nanopartículas de oro (GNPs) que se describen en la Tabla 1.

50 Figuras 2A y 2B: Se determina mediante difracción electrónica la estructura cristalina de las nanopartículas de oro preparadas.

La Figura 2A muestra el patrón de difracción electrónico de nanopartículas de referencia (se utilizó como referencia nanopartículas de oro con estructura Cúbica de Cara Centrada para establecer la cámara constante (λ) de la microscopía electrónica de transmisión) y de las nanopartículas de oro (GNPs) del ejemplo 1.

La Figura 2B presenta la indexación de las nanopartículas de oro (del ejemplo 1), patrón de difracción electrónica que muestra una estructura Cúbica de Cara Centrada (CFC, de sus siglas en inglés) de las nanopartículas de oro.

Indexar el patrón de difracción electrónico consiste en las siguientes etapas:

- 1) Establecer la cámara constante a partir del patrón de difracción electrónico de referencia,
- 5 2) Medir el diámetro del anillo (D1, D2, ..., Dn) del patrón de difracción electrónico de las nanopartículas de oro del ejemplo 1,
- 3) Calcular el d_{hkl} , utilizando la expresión $d_{hkl} = L^* \lambda / (Dn/2)$,
- 4) Utilizar los datos de la estructura base existente para indexar cada anillo.

Figuras 3A y 3B:

- 10 La Figura 3A muestra los ensayos de supervivencia clonogénica utilizando células de cáncer de colon HT29 irradiadas con Rayos-X de 200 KVp de energía, en ausencia (control negativo) o en presencia de 12 μM , 20 μM y 130 μM de oro a nivel celular para nanopartículas de oro con un tamaño de partícula de 15 nm (ORO-15 del ejemplo 1). La dosis de radiación varía de 0 (sin radiación) a 4 Gy.

Control negativo con HT29: puntos cuadrados

- 15 Nanopartículas de Oro-15 con HT29 12 μM : puntos en cruz

Nanopartículas de Oro-15 con HT29 20 μM : puntos en triángulo

Nanopartículas de Oro-15 con HT29 130 μM : puntos en círculo

- 20 La Figura 3B muestra los ensayos de supervivencia clonogénica utilizando células de cáncer de colon HT29 irradiadas con Rayos-X de 200 HVp de energía, en ausencia (control negativo) o en presencia de 17 μM , 52 μM y 119 μM de oro a nivel celular para nanopartículas de oro con un tamaño de partícula de 80 nm (ORO-80 del ejemplo 1). La dosis de radiación varía de 0 (sin radiación) a 4 Gy.

Control negativo con HT29: puntos cuadrados

Nanopartículas de Oro-80 con HT29 17 μM : puntos en cruz

Nanopartículas de Oro-80 con HT29 52 μM : puntos en triángulo

- 25 Nanopartículas de Oro-80 con HT29 119 μM : puntos en círculo

Las Figuras 4A y 4B: Efecto del tamaño de las nanopartículas de oro en el Factor de Intensificación de la Dosis (de sus siglas en inglés, DEF) para una concentración de oro similar a nivel celular, también se identifican en la presente memoria como concentración de oro por célula diana.

Figura 4A

- 30 Se expresa la concentración de oro (Au) a nivel celular en μM .

Concentración de oro menor de 20 μM ($[\text{Au}] < 20 \mu\text{M}$): puntos en cruz

Concentración de oro entre 20 μM y 83 μM ($20 \mu\text{M} \leq [\text{Au}] \leq 83 \mu\text{M}$): puntos en diamante

Concentración de oro entre 95 μM y 148 μM ($95 \mu\text{M} \leq [\text{Au}] \leq 148 \mu\text{M}$): puntos en cuadrado

Concentración de oro a 400 μM ($[\text{Au}] = 400 \mu\text{M}$): puntos en triángulo

- 35 Figura 4B

La concentración de oro (Au) por célula diana se expresa como sigue:

Célula: Au = 1: X (X se expresa en nmoles)

Célula: Au \leq 1 : 15 x10⁻⁵: puntos en cruz

1 : 20⁺10⁻⁵ \leq Célula: Au \leq 1 : 45 x10⁻⁵: puntos en diamante

- 40 1 : 60⁺10⁻⁵ \leq Célula: Au \leq 1 : 110 x10⁻⁵: puntos en cuadrado

Célula: Au = 1 : 182 x10⁻⁵: puntos en triángulo

Figuras 5A y 5B:

La Figura 5A muestra un efecto límite para una nanopartícula de oro de tamaño ≥ 80 nm. La concentración de oro a nivel celular estaba entre 20 μM y 83 μM .

La concentración de oro correspondiente por célula diana estaba entre 20×10^{-5} nmoles y 45×10^{-5} nmoles.

5 Se establecen dos curvas de tendencia lineal con una diferencia significativa entre sus respectivos valores de la pendiente: las nanopartículas de oro con un tamaño entre 15 nm y 60 nm presentan una curva de tendencia lineal con una pendiente de 0,0033. Las nanopartículas de oro con un tamaño entre 80 nm y 105 nm presentan una curva con tendencia lineal con una pendiente de 0,0384. Se reveló una relación de las pendientes mediante dichas curvas de aproximadamente 10. El efecto límite se observó cuando se considera que el DEF está inducido por el tamaño de las nanopartículas metálicas cuando dicho tamaño es de aproximadamente 80 nm o más.

La Figura 5B muestra el efecto límite para el tamaño de nanopartícula de oro ≥ 80 nm. La concentración de oro a nivel celular estaba entre 95 μM y 148 μM .

La concentración de oro correspondiente por célula diana estaba entre 60×10^{-5} nmoles y 110×10^{-5} nmoles.

15 Se establecieron dos curvas de tendencia lineal con una diferencia significativa entre sus respectivos valores de pendiente: Las nanopartículas de oro con un tamaño entre 15 nm y 60 nm presentan una curva de tendencia lineal con una pendiente de 0,0025. Las nanopartículas de oro con un tamaño entre 80 nm y 105 nm presentan una curva de una tendencia lineal con una pendiente de 0,0865. Se reveló una relación de las pendientes mediante dichas curvas de aproximadamente 30. El efecto límite se observó cuando se considera que el DEF está inducido por el tamaño de las nanopartículas metálicas cuando dicho tamaño es de aproximadamente 80 nm o más.

20 Figuras 6A y 6B:

La Figura 6A muestra la atenuación de Rayos-X como una función de la concentración de oro para cada nanopartícula de oro que se describe en el ejemplo 1, Tabla 1.

Valor HU como una función de [Au] (g/L) para ORO-15: puntos en diamante

Valor HU como una función de [Au] (g/L) para ORO-30: puntos en cuadrado

25 Valor HU como una función de [Au] (g/L) para ORO-60: puntos en triángulo

Valor HU como una función de [Au] (g/L) para ORO-80: puntos en cruz

Valor HU como una función de [Au] (g/L) para ORO-105: puntos +

30 La Figura 6B muestra el impacto del tamaño de la nanopartícula de oro en la atenuación de Rayos-X. La pendiente para cada tamaño de partícula se obtiene de la Figura 6A y se presenta como una función del tamaño de la nanopartícula de oro.

Figuras 7A y 7B:

La Figura 7A muestra la fracción superviviente bajo una radiación de 4 Gy (SF4) de células HT29 incubadas con nanopartículas de oro (ORO-60 del ejemplo 1) durante menos de 5 minutos.

35 La Figura 7B muestra la fracción superviviente bajo una radiación de 4 Gy (SF4) de células HT29 incubadas con nanopartículas de oro (ORO-60 del ejemplo 1) durante aproximadamente 12 horas.

Descripción detallada de la invención

40 Los inventores han encontrado sorprendentemente que una nanopartícula fabricada de un metal, preferiblemente un metal que tiene un número atómico (Z) de al menos 25, y que tiene, como el tamaño más grande, un tamaño comprendido entre aproximadamente 80 y 105 nm, puede mejorar sustancialmente el efecto terapéutico de una radiación local destinada a modificar, alterar o destruir células, tejidos u órganos anormales en un animal.

Se observó por primera vez una fuerte mejora de la eficacia de la radioterapia utilizando nanopartículas metálicas como se describen en la presente memoria (cf. Figuras 4A, 4B, 5A y 5B por ejemplo se refieren a las nanopartículas de oro).

45 En la presente memoria el término "nanopartícula" se refiere a productos, en particular productos sintéticos, con un tamaño en el intervalo nanométrico.

En el contexto de la presente invención, el término tamaño se refiere al diámetro de mayor dimensión del núcleo metálico de la nanopartícula. Normalmente, el diámetro de mayor dimensión de una nanopartícula de forma circular o esférica, o la mayor longitud de una nanopartícula es de forma ovoide u oval.

5 La forma de la nanopartícula puede ser por ejemplo circular, plano, alargado, esférico, ovoide u oval, y similar. La forma se puede determinar o controlar mediante el método de producción, y adaptarse por el experto en la técnica según a las aplicaciones deseadas.

Como la forma de las partículas puede influir en su "biocompatibilidad", se prefieren las partículas que tienen una forma bastante homogénea. Por razones farmacocinéticas, se prefieren por tanto nanopartículas que sean esencialmente con forma esférica, circular u ovoide. Se prefiere particularmente la forma esférica o circular.

10 El tamaño más grande de las nanopartículas según la invención se comprende ventajosamente, como se demostró mediante la parte experimental, entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 130 nm, ventajosamente entre aproximadamente 75 ó 80 nm y aproximadamente 105 nm, preferiblemente entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 95 nm o entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 90 ó 95 nm.

15 Los inventores sorprendentemente demuestran por primera vez que la penetración de la nanopartícula en la célula diana, una célula tumoral por ejemplo, no requiere, en el contexto de la presente invención, modificar, destruir o alterar dicha célula. De hecho, se ha observado por los inventores un efecto equivalente en células diana en ambas condiciones, en donde las nanopartículas se han incorporado por las células diana o que están en contacto, en particular contacto externo, con dichas células.

20 Los inventores describen en la presente memoria la utilización de una nanopartícula metálica como se divulga en la presente memoria, o de una población de tales nanopartículas metálicas, para preparar una composición farmacéutica destinada a perturbar, modificar, alterar o destruir células diana de mamíferos cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes. En dicha población, las nanopartículas se fabrican de un metal, teniendo el metal preferiblemente un número atómico (Z) de al menos 25. Ventajosamente, el tamaño medio más grande de las nanopartículas de la población está entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 130 nm, ventajosamente entre aproximadamente 75 ó 80 nm y aproximadamente 105 nm, preferiblemente entre aproximadamente 75 nm y aproximadamente 95 nm o entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 90 ó 95 nm.

25 En una población típica de nanopartículas, como se refiere anteriormente, constituida por nanopartículas obtenidas según un método de la técnica (como se describe además más abajo), en donde el tamaño medio más grande de una nanopartícula de la población está entre aproximadamente 80 nm y aproximadamente 105 nm, el tamaño más grande de una nanopartícula de la población se comprende entre aproximadamente 60 nm y 155 nm, normalmente entre 60, 65, 70, 75, ó 80, y, 105, 110, 130, 140, 150 ó 155 nm.

En otras palabras, el 95% (2σ) de la población se fabrica de nanopartículas cuyo tamaño más grande está entre aproximadamente 60 nm y aproximadamente 155 nm o el 68% (1σ) de la población se fabrica de nanopartículas cuyo tamaño más grande está entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 130 nm.

35 Las nanopartículas metálicas que se describen en la presente memoria se fabrican de un metal, dicho metal tiene preferiblemente un número atómico de al menos 25, ventajosamente de al menos 40 ó 50, más ventajosamente al menos 60 ó 70.

40 Tal metal se puede seleccionar del oro (Au - Z = 79), plata (Ag - Z = 47), platino (Pt - Z = 78), paladio (Pd - Z = 46), estaño (Sn - Z = 50), tantalio (Ta - Z = 73), iterbio (Yb - Z = 70), circonio (Zr - Z = 40), hafnio (Hf - Z = 72), terbio (Tb - Z = 65), tulio (Tm - Z = 69), cerio (Ce - Z = 58), disprosio (Dy - Z = 66), erbio (Er - Z = 68), europio (Eu - Z = 63), holmio (Ho - Z = 67), hierro (Fe - Z = 26), lantano (La - Z = 57), neodimio (Nd - Z = 60), praseodimio (Pr - Z = 59), y mezclas de los mismos.

El metal se selecciona preferiblemente del oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), paladio (Pd), estaño (Sn), circonio (Zr) y Hierro (Fe).

45 El número atómico (también conocido como el número de protones) es el número de protones que se encuentra en el núcleo de un átomo. Habitualmente se representa mediante el símbolo Z. El número atómico identifica únicamente a un elemento químico. En un átomo de carga neutral, el número atómico es igual al número de electrones.

Z participa en la capacidad de absorción de las radiaciones entrantes de las nanopartículas .

Las nanopartículas metálicas de la invención se fabrican de oro.

50 En la presente descripción, también es posible la mezcla de los metales como se describe anteriormente en una nanopartícula particular, o en una población particular de nanopartículas.

Se prefieren además las nanopartículas que tienen un área superficial específica pequeña (de sus siglas en inglés, SSA) para limitar sus interacciones con el entorno circundante.

El Área Superficial Específica (SSA) es una propiedad material de los sólidos que mide el área superficial total por unidad de masa (m^2/g). El SSA parece ser un factor importante que afecta en el sistema de interconexión biológico de la nanopartícula; en base a una masa-dosis igualitaria, se ha reportado que las partículas ultrafinas causan más efectos adversos, tal como inflamación, cuando se administran en un animal, que las partículas finas (véase por ejemplo Nel et Al. (Nature Materials 8 (2009) 543).

Las nanopartículas metálicas, cuyo tamaño más grande está entre aproximadamente 80 y 105 nm son particularmente ventajosas respecto al SSA como se explica abajo.

Para el propósito de la presente invención, el área superficial específica de la nanopartícula se comprende por ejemplo entre aproximadamente $1 m^2/g$ y $50 m^2/g$. El área superficial específica se comprende preferentemente entre $2 m^2/g$ y $20 m^2/g$.

El área superficial específica de una nanopartícula esférica se puede estimar utilizando la siguiente ecuación ($SSA = 3000 / (d \cdot r)$), siendo d la densidad de la nanopartícula metálica, y r el radio de la nanopartícula.

Por lo tanto, nanopartículas de oro esféricas con un tamaño de partícula de 15, 30, 60, 80 y 100 nm desarrollarán un área superficial específica de 20,7, 10, 3, 5,2, 3,9 y $3,1 m^2/g$ respectivamente, para una nanopartícula de oro de densidad 19,32.

Nanopartículas esféricas de hierro con un tamaño de partícula de 15, 30, 60, 80 y 100 nm desarrollarán un área superficial específica de 50,8, 25,4, 12,7, 9,5 y $7,6 m^2/g$ respectivamente, para una nanopartícula de hierro de densidad 7,87.

Los inventores de la presente memoria divulgan que la sorprendente eficacia de las nanopartículas según la presente invención es debida principalmente a su tamaño. De hecho, cuando una nanopartícula, cuyo tamaño es de al menos 80 nm, se expone a radiaciones ionizantes, es capaz de generar más daños a las células diana que una nanopartícula de menor tamaño, en particular una nanopartícula de 60 nm o menos. Por tanto, los inventores de la presente memoria destacan la influencia fundamental y directa del tamaño de la nanopartícula sobre la alteración celular bajo radiaciones ionizantes, favoreciendo los tamaños que se describen en la presente memoria aplicaciones terapéuticas en un mamífero, cuando dicho tamaño alcanza, y preferiblemente excede, el límite de 80 nm (véase la parte experimental). En la presente memoria se identifica el intervalo de tamaños del tamaño más grande de la nanopartícula, su habilidad para generar daños celulares más eficaces.

Una posible explicación de este mecanismo podría deberse a la capacidad de la nanopartícula para repartir la energía capturada (radiación ionizante) en una forma mejor o diferente.

En el ejemplo 2 y 3, para diferenciar la influencia del tamaño de la nanopartícula de oro de la influencia de la concentración de oro en el efecto terapéutico inducido por las nanopartículas bajo radiación, los inventores realizaron todos los ensayos *in vitro* utilizando el tamaño de la nanopartícula de oro como único parámetro ajustable. Los resultados experimentales obtenidos por los inventores revelaron la sorprendente influencia del tamaño de la nanopartícula (para una concentración metálica constante) en la amplificación de la eficacia terapéutica (capacidad para matar células y/o prevenir que las células se dividan).

Para producir un efecto terapéutico eficaz bajo radiaciones ionizantes, la utilización de nanopartículas metálicas con un tamaño de nanopartícula ≥ 80 nm requiere de una concentración metálica por célula diana que sea entre aproximadamente 2 y 7 veces inferior, en particular entre 4 y 7 veces o entre 2 y 5 veces, a la concentración del metal por célula diana requerida cuando se utilizan nanopartículas metálicas con un tamaño de nanopartícula de aproximadamente 60 nm o menos (véanse los ejemplos 2 y 3 respecto GNPs).

Por lo tanto actualmente es posible gracias a la presente invención, administrar al paciente una cantidad de metal significativa y ventajosamente reducida con una eficacia de tratamiento similar, asociada a una reducción de los efectos secundarios perjudiciales.

La presente invención permite además una reducción significativa del número de etapas de administración en el contexto de un tratamiento radioterápico en particular, normalmente en el transcurso de un protocolo de radiación multi fraccionado como se realiza en clínica hasta el momento. De hecho, las nanopartículas que se describen en la presente solicitud de patente son lo suficientemente grandes para favorecer su retención en el tejido tumoral. En la bibliografía se ha observado una eliminación por el tejido diana sustancialmente reducida de las nanopartículas metálicas de mayor tamaño (CHANG et al. Cancer Sci. 99 (2008) 1479; Hainfeld et al., Phys. Med. Biol 49 (2004) N309).

Las dosis de radiaciones ionizantes requeridas son preferiblemente dosis comprendidas entre aproximadamente 0,05 Grays y aproximadamente 16 Grays, preferiblemente entre aproximadamente 0,05 Grays y aproximadamente 6 Grays, para aplicaciones realizadas *in vitro*.

Las dosis están comprendidas entre más de aproximadamente 0,05 Grays y menos de aproximadamente 16 ó 30 Grays para aplicaciones realizadas, en particularmente localmente, *ex vivo* o *in vivo*.

El intervalo de radiaciones ionizantes total en el ser humano según la práctica actual oscila de aproximadamente 1,5 Grays a aproximadamente 85 Grays. Un aumento de la radiación adicional de aproximadamente 40 Grays se puede proporcionar también en el ser humano, según la práctica actual.

5 La dosis total de radiaciones repartida se puede proporcionar siguiendo diferentes programas tales como dosis únicas, dosis fraccionadas, dosis hiperfraccionadas, etc.

Las nanopartículas irradiadas que se describen en la presente memoria proporcionan, como se demuestra en la sección experimental, un claro efecto terapéutico mejorado cuando se compara con el efecto obtenido utilizando nanopartículas irradiadas de tamaños más pequeños.

10 Las nanopartículas que se describen en la presente memoria son ventajosamente biocompatibles, es decir, se pueden administrar de forma segura a un organismo animal, normalmente un mamífero, en particular un ser humano, para proporcionar su efecto terapéutico. Dicha biocompatibilidad se puede garantizar por ejemplo mediante la naturaleza del metal o metales que constituyen la partícula y/o mediante un recubrimiento opcional.

15 Las nanopartículas preferidas según la invención se recubren con un recubrimiento biocompatible con independencia de la vía de administración. Cuando las nanopartículas de la presente invención se administran a un sujeto a través de la vía intravenosa (IV), tal recubrimiento biocompatible es particularmente ventajoso para optimizar la biodistribución de las nanopartículas en el contexto del efecto EPR que se describe anteriormente. Se prefiere un recubrimiento de la nanopartícula biocompatible completo, en particular en el contexto IV, para evitar la interacción de la superficie de la partícula con cualquier elemento de reconocimiento (macrófago, opsoninas, etc). El "recubrimiento completo" implica la presencia de moléculas biocompatibles de una densidad muy alta capaz de crear al menos una monocapa completa sobre la superficie de la partícula. Dicho recubrimiento es responsable del también llamado "efecto encubierto" de la nanopartícula.

20 El recubrimiento biocompatible permite o favorece (dependiendo del metal seleccionado del que se fabrique la nanopartícula) en particular la estabilidad de la nanopartícula 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 (5%) y/o NaCl (0,9%), que se requiere para una administración farmacéutica.

25 Tal recubrimiento biocompatible se obtiene mediante tratamiento de la nanopartícula con un agente tratante superficial.

30 La estabilidad se puede confirmar mediante dispersión dinámica de la luz de las nanopartículas metálicas en una suspensión biocompatible o mediante cuantificación ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente) del elemento metálico antes y/o después de la filtración, de las nanopartículas metálicas en una suspensión biocompatible, en un filtro de 0,22 µm.

35 Ventajosamente, dicho recubrimiento protege la integridad de las partículas *in vivo*, garantiza o mejora la biocompatibilidad de las mismas, y facilita una funcionalización opcional de las mismas (por ejemplo con moléculas espaciadoras, polímeros biocompatibles, agentes diana, proteínas, etc). Una nanopartícula particular que se describe en la presente memoria comprende de hecho además, un componente superficial que activa dianas específicas de tejidos o células biológicas. Dicho componente superficial es preferiblemente un agente diana que permite la interacción de la nanopartícula con un elemento de reconocimiento presente en la célula diana. Tales agentes diana pueden actuar una vez que las nanopartículas se acumulen en el tumor. Como la conformación del agente diana será responsable de su interacción con la diana, la densidad de dicho agente diana se controla cuidadosamente. De hecho una alta densidad del mismo puede alterar la conformación del agente diana y en consecuencia su reconocimiento por la célula diana (véase por ejemplo J A Reddy et al. Gene therapy 9 (2002) 1542; Ketan B. Ghaghada et al. Journal of Controlled Release 104 (2005) 113). Además, una densidad alta del agente diana puede favorecer la liberación de las nanopartículas por el Sistema Retículo Endotelial (de sus siglas en inglés, RES) durante la circulación en la vasculatura.

45 El recubrimiento biocompatible puede estar compuesto de cualquier estructura amorfa o cristalina.

En general, el recubrimiento puede ser no-biodegradable o biodegradable. Ambas opciones se pueden usar para el propósito de la presente invención.

50 Ejemplos de recubrimientos no-biodegradables son uno o más materiales o agentes tratantes superficiales que se selecciona del grupo que consiste en sílice, alúmina, azúcar (agarosa por ejemplo), fosfato, silano, tiol, compuestos zwitteriónicos, lípidos, polímeros de carbono saturado (óxido de polioxietileno por ejemplo) y polímeros inorgánicos, reticulado o no, modificado o no (polimetacrilato o poliestireno por ejemplo), así como combinaciones de los mismos.

55 Ejemplos de recubrimientos biodegradables son por ejemplo uno o más materiales o agentes tratantes superficiales que se selecciona 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.

- Los materiales, compuestos o agentes tratantes superficiales anteriormente mencionados, se pueden utilizar en solitario o en combinaciones, mezclas o en conjunto, compuestos o no, covalentes o no, opcionalmente en combinación con otros compuestos. Por otra parte, también es posible utilizar cualquiera de los materiales anteriormente mencionados, siendo dicho material soluble en agua de forma natural o soluble en lípido o que sea modificado artificialmente para volverse soluble en agua o soluble en lípido.
- 5
- El recubrimiento biocompatible comprende o se fabrica preferiblemente de un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en un agente inorgánico, un agente orgánico, y una mezcla o combinación de los mismos. 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, calcio y/o magnesio.
- 10
- Tales agentes se pueden utilizar para cargar la nanopartícula bien positivamente o negativamente para modular las interacciones de dicha nanopartícula con el medio biológico.
- Un agente inorgánico que se selecciona del grupo que consiste en, por ejemplo magnesio y calcio, brindará una carga positiva a la superficie de la nanopartícula a un pH de 7.
- Por ejemplo, se puede utilizar silicio para brindar una carga negativa a la superficie de la nanopartícula a un pH de 7.
- 15
- Un agente orgánico apropiado puede ser cualquier agente que comprende una función capaz de interactuar con una nanopartícula como se describe en la presente memoria y una función que confiere biocompatibilidad a dicha nanopartícula.
- El agente que comprende una función capaz de interactuar con una nanopartícula puede ser por ejemplo un carboxilato (R-COO⁻), un silano (R-Si(OR)₃), una función fosfónica (R-PO(OH)₂), una función fosfórica (R-O-PO(OH)₂), o una función tiol (R-SH).
- 20
- El agente que comprende una función capaz de conferir biocompatibilidad a una nanopartícula como se describe en la presente memoria 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) polietilenóxido, alcohol de Polivinilo, Poliacrilato, Poliacrilamida (poli(N-isopropilacrilamida)), Policarbamida, un biopolímero o polisacárido tal como Dextrano, Xilano, celulosa, colágeno, y un compuesto zwitteriónico tal como polisulfobetaina, etc.
- 25
- Un agente con una función electrostática positiva puede ser una amina tal como aminopropiltrióxosilano, polilisina o 2-aminoetanol.
- Un agente con una carga 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 tiol (por ejemplo un carboxi terminado en tiol tal como ácido mercaptosuccínico).
- 30
- El recubrimiento puede contener también diferentes grupos funcionales (o segmentos de enlace), permitiendo que cualquier molécula de interés se una a la superficie de la partícula, tal como un componente superficial que active dianas específicas de tejidos o células biológicas.
- Un ejemplo típico de una nanopartícula según la invención es una nanopartícula que se fabrica de oro. Tal nanopartícula de oro puede comprender, además, como un recubrimiento biocompatible, un recubrimiento fabricado de compuestos tiol tal como polietilenglicol-tiol (PEG-SH), tioglucosa, o compuestos de carboxilato tal como citrato.
- 35
- Otro ejemplo de una nanopartícula según la invención es una nanopartícula fabricada de oro que comprende, como un recubrimiento biocompatible, un recubrimiento fabricado de agentes tiol que soporta al menos un grupo funcional que se selecciona de polietileno, amina o carboxilo, o un recubrimiento que consiste en citrato.
- 40
- Las presentes nanopartículas ofrecen la ventaja de ser fáciles de preparar. De hecho los métodos para producir nanopartículas metálicas son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Brian L. Cushing et al. (Chem. Rev. 104 (2004) 3893). Normalmente, las nanopartículas metálicas se obtienen por precipitación de un elemento metálico en una disolución acuosa o una no-acuosa, implicando dicha precipitación la reducción química del catión metálico. Otra posible manera para producir las nanopartículas metálicas es a través de la reducción asistida por radiación.
- 45
- Otro objetivo que se describe en la presente memoria se refiere a un método para producir una nanopartícula metálica o población de nanopartículas metálicas tal como las que se definen anteriormente en la presente memoria, que comprende:
- proporcionar un elemento metálico como el que se identifica en la presente memoria, preferiblemente un elemento metálico que tiene un número atómico (Z) igual o superior a 25,
- 50
- preparar la nanopartícula metálica a partir de dicho elemento metálico mediante precipitación de dicho elemento metálico en un medio, en presencia de un agente reductor, y, opcionalmente

- añadir un agente complejante al medio (el agente complejante se añade antes de, durante o después de la adición del agente reductor), siendo el agente reductor y el agente complejante opcionalmente el mismo compuesto, y, opcionalmente,
- recubrir la nanopartícula utilizando un agente tratante superficial como se describe anteriormente.

5 Un medio que se utiliza normalmente en la presente invención se puede seleccionar de una disolución acuosa, una disolución alcohólica, etc.

Un agente reductor que se emplea normalmente se puede seleccionar del citrato, ácido ascórbico, ácido 2-mercaptosuccínico, etc.

10 Un agente complejante que se emplea normalmente se puede seleccionar del citrato, tiol tal como el ácido 2-mercaptosuccínico, etc.

La etapa de recubrir ventajosamente consiste en poner la nanopartícula en contacto con un agente tratante superficial como se define anteriormente.

En un aspecto particular, un método para producir una población de nanopartículas comprende las siguientes etapas, preferiblemente para:

- 15 a) proporcionar, como un precursor, un elemento metálico como se identifica en la presente memoria, preferiblemente un elemento metálico que tiene un número atómico (Z) igual o superior a 25,
- b) precipitar el precursor de la etapa a) en un medio polar como se define anteriormente en presencia de un compuesto reductor, preferiblemente ajustando el precursor y/o reduciendo la concentración del compuesto y/o la temperatura,
- 20 c) añadir opcionalmente un agente complejante en el medio polar, antes de, durante o después de la etapa de precipitación b), siendo opcionalmente el agente complejante y el agente reductor el mismo compuesto,
- d) lavar opcionalmente la suspensión obtenida al final de la etapa b) o c) para eliminar cualquier impureza, agente reductor y/o agente complejante,
- e) concentrar opcionalmente la suspensión obtenida al final de la etapa d), y
- 25 f) recubrir opcionalmente las nanopartículas.

La población descrita anteriormente se puede someter además a una etapa de formulación antes de administrarse a un sujeto.

En un ejemplo particular, un método para producir una nanopartícula según la presente invención, estando la nanopartícula fabricada de un metal, comprende preferiblemente las siguientes etapas para:

- 30 a) precipitar una disolución del precursor de cloruro de oro (tal como, en particular, HAuCl_4 o KAuCl_4) en disolución acuosa en presencia de un agente reductor (tal como citrato), estando la temperatura del medio comprendida entre 50°C y 100°C ,
- b) lavar opcionalmente la suspensión de nanopartículas metálicas obtenida para eliminar cualquier impureza,
- c) concentrar opcionalmente la suspensión de nanopartículas metálicas obtenida de esta manera,
- 35 d) recubrir opcionalmente dichas nanopartículas metálicas poniéndolas en contacto con un agente tratante superficial como se define anteriormente.

40 Otro objetivo de la descripción se basa en cualquier composición que comprende nanopartículas, tales como se definen anteriormente en la presente memoria y/o que se pueden obtener mediante los métodos que se describen en la presente memoria. Aunque no es obligatorio, las partículas que se describen en las composiciones de la presente memoria tienen ventajosamente una forma bastante homogénea como se indica anteriormente.

Se pueden obtener suspensiones biocompatibles que comprenden una alta concentración del elemento metálico (300g/L, por ejemplo) con un método como el que describe en la presente memoria.

45 Un objetivo particular de la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende nanopartículas, tales como se definen anteriormente en la presente memoria y, opcionalmente, un excipiente o vehículo aceptable farmacéuticamente.

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

5 El excipiente o vehículo que se emplea puede estar en cualquier soporte clásico para este tipo de aplicación, tal como por ejemplo disoluciones salinas, isotónicas, estériles, tamponadas, y similares. Pueden comprender también estabilizadores, edulcorantes, tensioactivos, y similares. Se pueden formular por ejemplo en ampollas, aerosoles, frascos, comprimidos, cápsulas, utilizando técnicas de formulación farmacéutica conocidas.

10 Ventajosamente, la concentración de metal que se administra por célula diana está entre aproximadamente 10^{-7} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-7} (nmoles)) y aproximadamente 5×10^{-1} nmoles (Célula: [metal] = 1: 5×10^{-1} (nmoles)). Más preferiblemente, la concentración de metal por célula diana está entre aproximadamente 10^{-6} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-6} (nmoles)) y aproximadamente 2×10^{-1} nmoles (Célula: [metal] = 1: 2×10^{-1} (nmoles)).

15 Incluso más preferiblemente, la concentración de metal por célula diana está entre aproximadamente 10^{-6} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-6} (nmoles)) y aproximadamente 10^{-3} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-3} (nmoles)) o entre aproximadamente 10^{-6} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-6} (nmoles)) y aproximadamente 10^{-4} nmoles (Célula: [metal] = 1: 10^{-4} (nmoles)).

En las composiciones que se describen en la presente memoria, concentraciones apropiadas o deseables del metal se comprenden entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 100 mg de metal por gramo de células mamíferas diana, tal como, en particular, células tumorales mamíferas, normalmente entre aproximadamente 1 mg o 5 mg y 50 mg del metal por gramo de células mamíferas diana.

20 Generalmente, las composiciones en forma líquida comprenden entre aproximadamente 0,01 g/L y 300 g/L de metal, preferiblemente al menos 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L o 250 g/L.

Lo ideal es que la cuantificación del metal se realice mediante ICP-MS.

25 Las concentraciones de metal que se identifican anteriormente varían dependiendo del sujeto paciente, la vía de administración seleccionada, la naturaleza de las células diana, etc., y son fácilmente ajustables por el experto en la técnica.

Las nanopartículas, poblaciones de nanopartículas y composiciones que se describen en la presente memoria, son productos que se pueden emplear en muchos campos, particularmente en medicina humana o veterinaria.

Es un objetivo de la presente descripción emplear un producto como se describe en la presente memoria para alterar, destruir una célula, tejido u órgano diana.

30 Dependiendo de la energía de las radiaciones ionizantes, las partículas pueden activar la alteración de células y/o tejidos, o la destrucción de los mismos.

35 De hecho, un objetivo particular de la descripción se basa en la empleo de una nanopartícula metálica o una población de nanopartículas, como se describe en la presente memoria, para preparar una composición farmacéutica destinada a alterar, destruir células diana en un animal, cuando dichas células se exponen a radiaciones, en particular radiaciones ionizantes, y con los métodos terapéuticos correspondientes.

La composición farmacéutica puede comprender además un compuesto terapéutico adicional, distinto de una nanopartícula o de una población de nanopartículas como se describe en la presente memoria, destinado también a tratar el cáncer.

40 Otro objetivo particular de la descripción se basa en un método para inducir o causar la alteración, lisis, apoptosis o destrucción de células diana, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprende la puesta en contacto de células, en particular de células diana, con una o más nanopartículas tal como se define anteriormente en la presente memoria, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir a las nanopartículas interaccionar con dichas células y, exponiendo las células a radiaciones, siendo radiaciones apropiadas en particular las radiaciones ionizantes, preferiblemente Rayos-X, Rayos-γ, isótopos radiactivos y/o rayos de electrones, dicha exposición induce o causa la alteración, lisis, apoptosis o destrucción de dichas células diana.

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

50 A este respecto, un objetivo particular de la descripción se basa en el empleo de una nanopartícula, o una población de tales nanopartículas, como se define anteriormente en la presente memoria, para producir una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un cáncer en particular, cuando se usa en combinación con radiaciones ionizantes (como se define anteriormente).

La presente divulgación abarca además el empleo de una composición, nanopartícula o población de nanopartículas tal como se define anteriormente en la presente 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 radiaciones ionizantes como se define anteriormente.

5 Otro objetivo particular de la descripción se basa en un método para inducir o causar la alteración, lisis o destrucción de células diana, en particular células cancerígenas, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, que comprende la puesta en contacto de las células diana con una o más nanopartículas tal como se define anteriormente en la presente memoria, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir a las nanopartículas interactuar con dichas células y, exponiendo las células a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes como se define anteriormente, dicha
10 exposición induce o causa la alteración, lisis, apoptosis o destrucción de dichas células.

Otro objetivo de la descripción se refiere a un método para prevenir o tratar un trastorno, en particular un cáncer, o aliviar los síntomas del trastorno, en un sujeto o paciente, que comprende administrar al paciente que padece el trastorno una nanopartícula, una población de nanopartículas o una composición tal como se define anteriormente en la presente memoria, en condiciones que permiten a las nanopartículas interactuar (estar en contacto) con las
15 células anormales, en particular con las células del cáncer, y posteriormente tratar al sujeto mediante la exposición de dicho sujeto a radiaciones ionizantes, conduciendo tal radiación a una alteración, perturbación o destrucción funcional de las células anormales del paciente, previendo o tratando de esa manera el cáncer.

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

20 Las nanopartículas que se describen en la presente memoria sometidas a radiaciones ionizantes, en el contexto de la radioterapia, se pueden emplear en asociación con un protocolo de terapia del cáncer diferente. Tal protocolo se puede seleccionar del grupo que consiste en cirugía, radiocirugía, quimioterapia, un tratamiento que comprende la administración de un citostático o citostáticos, un citotóxico o citotóxicos, una terapia dirigida, una vacuna, y cualquier otro producto biológico o inorgánico destinado a tratar el cáncer.

25 Sorprendentemente, las nanopartículas que se describen en la presente memoria se pueden emplear además en el contexto de radioterapia en solitario con un incremento observado de la eficacia.

La invención se puede utilizar para tratar cualquier tipo de tumor maligno tal como tumores hematológicos o neoplasias, y tumores sólidos, en particular de origen epitelial, neuroectodermal o mesenquimal. Además, las nanopartículas se pueden utilizar para tratar una lesión premaligna o una enfermedad benigna específica donde la
30 terapia por radiación se utiliza y/o indica de forma clásica.

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

35 Las nanopartículas se pueden emplear en cualquier momento a lo largo del periodo del tratamiento anticanceroso. Se pueden administrar, por ejemplo, como un neoadyuvante (antes de una intervención quirúrgica para exéresis del cáncer) o como adyuvante (después de la cirugía).

Las nanopartículas se pueden emplear también para tumores avanzados que no se pueden eliminar quirúrgicamente.

40 Como se explica en la presente memoria, la radiación se puede aplicar en cualquier momento después de la administración de las partículas, en una o más ocasiones, utilizando cualquier sistema de radioterapia disponible en la actualidad.

Las nanopartículas que se describen en la presente memoria se destinan a utilizarse en particular para tratar el cáncer donde la radioterapia es un tratamiento clásico. Tal cáncer se puede seleccionar en particular del grupo que
45 consiste en cáncer de piel, incluyendo neoplasmas malignos asociados a SIDA, melanoma; tumores del sistema nervioso central que incluyen el cerebro, tronco encefálico, cerebelo, hipófisis, médula espinal, ojo y órbita; tumores de la cabeza y cuello; cáncer de pulmón; cáncer de mama; tumores gastrointestinales tales como cáncer de hígado y cáncer del tracto hepatobiliar, colon, cáncer del recto y ano, estómago, páncreas, cáncer de esófago; tumores genitourinarios en varones tales como cánceres de próstata, testículos, pene y uretra; tumores ginecológicos tales como cánceres de cérvix uterino, endometrio, ovario, trompa de Falopio, vagina y vulva; tumores adrenal y retroperitoneal; sarcomas de hueso y tejido blando 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.
50

Las partículas se pueden activar dentro de un gran intervalo de la dosis total de radiación. Se definen cantidades y programas (planificación y reparto de las radiaciones en una dosis única, o en el contexto de un protocolo
55

fraccionado o hiperfraccionado, etc.) para cualquier enfermedad/sitio anatómico/etapa de la enfermedad configuración del paciente/edad del paciente (niño, adulto, paciente anciano), y constituye el cuidado estándar para cualquier situación específica.

5 La radiación se puede aplicar en cualquier momento después de la administración de las nanopartículas, en una o más ocasiones, utilizando cualquier sistema de radioterapia disponible en la actualidad. Las nanopartículas se pueden administrar mediante diferentes vías, tal como la local (intra-tumoral (IT) en particular), subcutánea, intravenosa (IV), intra-dérmica, intra-arterial, vía respiratoria (inhalación), intra peritoneal, intra muscular y vía oral (*per os*). Las nanopartículas se pueden administrar además en una intracavidad tal como la cavidad virtual de la base del tumor tras la tumorectomía.

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

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

20 Como se indica anteriormente, radiaciones o fuentes de ionización apropiadas son, preferiblemente, radiaciones ionizantes y se pueden seleccionar ventajosamente del grupo que consiste en Rayos-X, Rayos-gamma, rayos de electrones, rayos de iones e isótopos radiactivos o emisiones de radioisótopos. Los Rayos-X es una fuente de ionización particularmente preferida.

25 Las radiaciones ionizantes son normalmente de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 25.000 KeV, en particular de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 6.000 KeV (fuente LINAC), o de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 1.500 KeV (tal como una fuente de cobalto 60). La utilización de una fuente de Rayos-X, particularmente se prefieren radiaciones ionizantes, es normalmente de aproximadamente 50 KeV a aproximadamente 12.000 KeV, por ejemplo de aproximadamente 50 KeV a aproximadamente 6.000 KeV.

En general y de una manera no-restrictiva, se pueden aplicar los siguientes Rayos-X en diferentes casos para activar las nanopartículas:

- Rayos-X de 50 a 150 KeV que son particularmente eficaces para un tejido diana superficial;
- Rayos-X (orto voltaje) de 200 a 500 KeV que pueden penetrar un tejido de 6 cm de espesor;
- 30 - Rayos-X (mega voltaje) de 1.000 KeV a 25.000 KeV. Por ejemplo, la ionización de nanopartículas para el tratamiento del cáncer de próstata se puede llevar a cabo a través de cinco Rayos-X focalizados con una energía de 15.000 keV.

35 Los isótopos radiactivos se pueden emplear alternativamente como una fuente de radiación ionizante (llamada curiterapia o braquiterapia). En particular, se pueden utilizar de manera ventajosa, Yodo I^{125} ($t_{1/2} = 60,1$ días), Paladio Pd^{103} ($t_{1/2} = 17$ días), Cesio Cs^{137} e Iridio Ir^{192} .

También se pueden emplear los inmunoradionucleidos(o ligandos inmunoradioetiquetados) como una fuente de radiación ionizante en el contexto de la radioinmunoterapia. Radionucleótidos adecuados para radioinmunoterapia pueden ser, por ejemplo, seleccionados de ^{131}I , ^{186}Re , ^{177}Lu o ^{90}Y .

40 Se pueden emplear también como una fuente de radiaciones ionizantes y/o rayos de neutrones, partículas cargadas tal como rayos de protones, rayos de iones tal como carbono, en particular rayos de iones de alta energía.

Se pueden emplear también rayos de electrones como una fuente de radiación ionizante con una energía comprendida entre 4 MeV y 25 MeV.

45 Se podría emplear una fuente de radiación monocromática para generar selectivamente rayos-X con una energía estrecha o que corresponde al límite de absorción de rayos-X deseados del átomo o átomos de la nanopartícula metálica.

Preferiblemente las fuentes de radiaciones ionizantes se pueden seleccionar del Acelerador Linear (LINAC), fuentes de Cobalto 60 y braquiterapia.

50 El término “en combinación” indica que el efecto buscado se observa cuando las células, tejidos u órganos de interés, estando en contacto con las nanopartículas de la invención, se activan mediante la fuente definida. Sin embargo, no es necesario que las partículas y los Rayos se administren simultáneamente, ni según al mismo protocolo.

5 La presente divulgación proporciona además kits que comprenden cualquiera de las nanopartículas o composiciones que se describen en la presente memoria. Normalmente, el kit comprende al menos una nanopartícula o población de nanopartículas como se describe en la presente memoria. Generalmente, el kit también comprende uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociada a tal envase o envases, se observa una etiqueta que proporciona instrucciones para el uso de los productos que pueden proporcionar la utilización de las nanopartículas, población de nanopartículas o composiciones según los presentes métodos.

Otros aspectos y ventajas de la invención quedarán claros en los siguientes ejemplos, que se proporcionan con propósitos ilustrativos y no como limitación.

10 Sección experimental

Ejemplo 1: síntesis y caracterización físico-química de nanopartículas de oro con diferentes tamaños.

Se obtienen nanopartículas de oro mediante reducción de cloruro de oro con citrato sódico en disolución acuosa. El protocolo se adaptó a partir de G. Frens Nature Physical Science 241 (1973) 21.

15 En un experimento típico, la disolución de HAuCl₄ se calienta hasta ebullición. Posteriormente, se añade una disolución de citrato sódico. La disolución resultante se mantiene bajo ebullición durante un periodo adicional de 5 minutos.

El tamaño de la nanopartícula se ajusta de 15 hasta 105 nm mediante modificación cuidadosa del citrato frente a la proporción del precursor de oro (cf. Tabla 1).

20 Después, se concentran las suspensiones de nanopartículas de oro preparadas utilizando un dispositivo de ultrafiltración (célula con agitación Amicon modelo 8400 de Millipore) con una membrana de celulosa de 30 kDa.

Las suspensiones resultantes se filtran finalmente a través de un filtro de membrana de 0,22 μm (membrana PES de Milipore) bajo campana laminar y se almacenan a 4°C.

El contenido de oro se determina mediante ICP-MS y se expresa como [Au] g/L.

25 El tamaño de partícula se determina utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) mediante el recuento de más de 200 partículas (Figura 1A), tomando la dimensión de la nanopartícula más grande para la medición del tamaño. Se establecen histogramas y se presentan la desviación media y estándar (Figura 1B).

Tabla 1:

Muestras	Tamaño de partícula (nm)	Síntesis		Estructura	[Au] g/L
		Citrato	HAuCl ₄		
Oro-15	15±2 (1σ)	20 mL 30 mM	500 mL 0,25 mM	CFC	17,86
Oro-30	32±10 (1σ)	7,5 mL 40 mM	500 mL 0,25 mM	CFC	16,90
Oro-60	60±10 (1σ)	2 mL 85 mM	500 mL 0,25 mM	CFC	4,98
Oro-80	80±10 (1σ)	1,2 mL 43 mM	200 mL 0,30 mM	CFC	10,67
Oro-105	105±25 (1σ)	1,2 mL 39 mM	200 mL 0,33 mM	CFC	5,06

Conclusión

30 Las nanopartículas de oro que se describen en la Tabla 1 se preparan según al mismo proceso de síntesis para asegurar las mismas propiedades características superficiales.

Las imágenes TEM muestran que las nanopartículas de oro sintetizadas son todas de forma esférica y/o ovoide.

Los patrones de difracción electrónica TEM muestran que todas las nanopartículas de oro sintetizadas presentan una estructura CFC.

35 Por lo tanto, de acuerdo con la técnica anterior, el tamaño de las nanopartículas de oro sólo varía, con un tamaño de partícula medio bien caracterizado y un tamaño polidisperso.

ES 2 616 628 T3

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)		
	[Au] μM	Número de Células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)
ORO-30			
ORO-60			
ORO-80			
ORO-105	6	$1,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{-5}$

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)		
	[Au] μM	Número de Células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)
ORO-15	12	$1,3 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-5}$
ORO-30	17	$1,3 \times 10^5$	$13,1 \times 10^{-5}$
ORO-60	16	$2,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^{-5}$
ORO-80	17	$2,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^{-5}$
ORO-105	17	$1,3 \times 10^5$	$13,6 \times 10^{-5}$

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)		
	[Au] μM	Número de Células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)
ORO-15	20	$9,7 \times 10^4$	$20,7 \times 10^{-5}$
ORO-30	40	$1,8 \times 10^5$	$22,6 \times 10^{-5}$
ORO-60	83	$2,2 \times 10^5$	$37,7 \times 10^{-5}$
ORO-80	52	$2,1 \times 10^5$	$24,9 \times 10^{-5}$
ORO-105	59	$1,4 \times 10^5$	$43,4 \times 10^{-5}$

ES 2 616 628 T3

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)		
	[Au] μM	Número de Células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)
ORO-15	130	$1,4 \times 10^5$	$92,0 \times 10^{-5}$
ORO-30	148	$1,4 \times 10^5$	$108,3 \times 10^{-5}$
ORO-60	95	$1,5 \times 10^5$	$61,9 \times 10^{-5}$
ORO-80	119	$1,8 \times 10^5$	$65,4 \times 10^{-5}$

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)		
	[Au] μM	Número de Células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)
ORO-15			
ORO-30			
ORO-60	400	$2,2 \times 10^5$	$181,8 \times 10^{-5}$
ORO-80			
ORO-105			

5 La Tabla 2 muestra la concentración de oro a nivel celular (μM) [o concentración de oro por célula diana (célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles))] para células cancerosas HT29 incubadas con diferentes concentraciones de oro (Au) para cada una de las nanopartículas de oro sintetizadas en el Ejemplo 1, Tabla 1.

Tabla 3A:

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM) Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)			DEF (4 Gy)
	[Au] μM	Número de células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)	
ORO-15	12	$1,3 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-5}$	0,98
ORO-30	17	$1,3 \times 10^5$	$13,1 \times 10^{-5}$	0,99
ORO-60	16	$2,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^{-5}$	1,09

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM)			DEF (4 Gy)
	Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)			
ORO-80	17	$2,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^{-5}$	0,98
ORO-105	17	$1,3 \times 10^5$	$13,6 \times 10^{-5}$	1,35

5 La Tabla 3A indica los valores DEF obtenidos para una dosis de radiación de 4 Gy, de las nanopartículas de oro que se describen en el Ejemplo 1, cuando la concentración de oro a nivel celular está por debajo de $20 \mu\text{M}$ [o que la concentración de oro por célula diana correspondiente está por debajo de 15×10^{-5} nmoles (Célula : Au \leq 1 : 15×10^{-5} nmoles)].

Tabla 3B:

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM)			DEF (4 Gy)
	Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)			
	[Au] μM	Número de células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)	
ORO-15	20	$9,7 \times 10^4$	$20,7 \times 10^{-5}$	0,96
ORO-30	40	$1,8 \times 10^5$	$22,6 \times 10^{-5}$	1,16
ORO-60	83	$2,2 \times 10^5$	$37,7 \times 10^{-5}$	1,13
ORO-80	52	$2,1 \times 10^5$	$24,9 \times 10^{-5}$	1,63
ORO-105	59	$1,4 \times 10^5$	$43,4 \times 10^{-5}$	2,59

10 La Tabla 3B indica los valores DEF obtenidos para una dosis de radiación de 4 Gy, de las nanopartículas de oro que se describen en el Ejemplo 1, cuando la concentración de oro a nivel celular está entre $20 \mu\text{M}$ y $83 \mu\text{M}$ [o que la concentración de oro por célula diana correspondiente está entre 20×10^{-5} nmoles y 45×10^{-5} nmoles (1 : 20×10^{-5} nmoles \leq Célula : Au \leq 1 : 45×10^{-5} nmoles)].

Tabla 3C:

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM)			DEF (4 Gy)
	Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)			
	[Au] μM	Número de células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)	
ORO-15	130	$1,4 \times 10^5$	$92,0 \times 10^{-5}$	1,57
ORO-30	148	$1,4 \times 10^5$	$108,3 \times 10^{-5}$	1,23

MUESTRAS DE ORO	Concentración de oro (Au) a nivel celular (μM)			DEF (4 Gy)
	Concentración de oro (Au) por célula diana Célula : Au = 1 : X (X expresada en nmoles)			
	[Au] μM	Número de células por mL	Célula:Au = 1:X (nmoles)	
ORO-60	95	$1,5 \times 10^5$	$61,9 \times 10^5$	1,63
ORO-80	119	$1,8 \times 10^5$	$65,4 \times 10^5$	3,36

5 La Tabla 3C indica los valores DEF obtenidos para una dosis de radiación de 4 Gy, de las nanopartículas de oro que se describen en el Ejemplo 1, cuando la concentración de oro a nivel celular está entre $95 \mu\text{M}$ y $148 \mu\text{M}$ [o que la concentración de oro por célula diana correspondiente está entre 60×10^{-5} nmoles y 110×10^{-5} nmoles ($1 : 60 \times 10^{-5}$ nmoles \leq Célula : Au \leq $1 : 110 \times 10^{-5}$ nmoles)].

Conclusión

Sorprendentemente, se observó un límite en el valor DEF para nanopartículas de oro con un tamaño de partícula ≥ 80 nm (véanse la Figuras 5A y 5B).

10 Ejemplo 3: Efecto del tamaño de la nanopartícula de oro en la eficacia *in vitro* cuando la capacidad de atenuación de Rayos-X de cada nanopartícula de oro ensayada es constante a nivel celular.

Protocolo: medición de la atenuación de Rayos-X

Se prepararon nanopartículas de oro con diferente concentración (expresada en [Au] g/L) en tubos de $200 \mu\text{L}$ y se colocaron en un soporte de poliestireno especialmente diseñado.

15 μCT se realizó utilizando un sistema μCT de Emplazamiento Eléctrico General con un voltaje anódico y una corriente de 50 kV y $450 \mu\text{A}$ respectivamente.

El escaneo se realizó utilizando un modo de resolución isotrópico de $90 \mu\text{m}$.

Se colocó cuidadosamente una pequeña región cilíndrica de interés en la imagen 3D en el centro de cada tubo para medir los valores de atenuación de los tubos llenos de fluido que contienen las dispersiones de las nanopartículas de oro.

20 Conclusión

Se observó un valor de atenuación de Rayos-X similar independientemente del tamaño de la nanopartícula de oro, para un tamaño comprendido entre 15 nm y 105 nm (véanse las Figuras 6A y 6B). Este resultado confirma el efecto límite de la eficacia observada para una partícula de tamaño ≥ 80 nm. Tal nanopartícula es capaz de generar más daños a nivel celular para una energía de Rayos-X absorbida dada. (véanse las Figuras 4A y 4B).

25 Ejemplo 4: Efecto de la localización a nivel celular de la nanopartícula de oro (interacción física con las membranas celulares tumorales y/o absorción celular) en la eficacia *in vitro*.

30 Las células HT29 se recubrieron con el número apropiado de células para formar entre 50 y 200 colonias según el tratamiento. Cuando las células se unieron, se añadió $50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$ o $400 \mu\text{M}$ de oro con un tiempo de incubación de menos de 5 minutos (sin incubación) o 12 horas. Se ensayaron las nanopartículas de oro con un tamaño de partícula de 60 nm (ORO-60 del ejemplo 1). Las células o no se irradiaron (simulación control), o se irradiaron con dosis de 2 Gy y 4 Gy utilizando un dispositivo de Rayos-X a 200 kVp. Después de la radiación, las células se incubaron entre 10 a 12 días a 37°C . Los clones se fijaron y se tiñeron con violeta cristal y se contaron para estimar la fracción superviviente clonogénica.

35 La figura 7A muestra la fracción de supervivencia a 4 Gy (SF4) de células HT29 incubadas con nanopartículas de oro (ORO-60 del ejemplo 1) durante menos de 5 minutos, y la Figura 7B muestra la fracción de supervivencia a 4 Gy (SF4) de células HT29 incubadas con nanopartículas de oro (ORO-60 del ejemplo 1) durante aproximadamente 12 horas.

Tabla 4:

DEF ORO-60	50 μ M	100 μ M	400 μ M
4 Gy, tiempo de incubación menor de 5 minutos	0,96	1,25	1,8
4 Gy, tiempo de incubación de 12 horas	0,88	1	1,5

La Tabla 4 representa el DEF de nanopartículas de oro (ORO-60) para una concentración de oro de 50 μ M, 100 μ M y 400 μ M, a 4 Gy, durante un tiempo de incubación de menos de 5 minutos o de 12 horas.

5 Conclusión

Los datos muestran, para una concentración de oro de 400 μ M, valores DEF significativamente similares para nanopartículas de oro incubadas menos de 5 minutos y para nanopartículas de oro incubadas 12 horas con células antes de la radiación.

10 Estos resultados demuestran que las nanopartículas de oro (GNPs) intensifican la respuesta de radiación de la célula diana sin ser necesario que las GNPs se internalicen por la célula. De hecho, y como es conocido por el experto en la técnica, son necesarias dos horas para permitir la absorción celular de aproximadamente el 50% de las nanopartículas presentes en el medio biológico (véase Chitrani et al., 2006, por ejemplo).

Cuando las nanopartículas están en contacto con las células cancerosas son ventajosamente capaces de inducir daños en las células cancerosas bajo radiación.

15 Los resultados experimentales anteriores de los ejemplos 1 a 4 destacan la capacidad de las nanopartículas metálicas para inducir un efecto terapéutico mejorado cuando se administran *in vivo* si la concentración metálica adecuada (proporcional al peso del tumor como es evidente para el experto en la técnica) está presente en el lugar del tumor (como se demuestra anteriormente no se requiere la absorción celular de las nanopartículas metálicas).

20 Se requiere una cantidad de metal significativamente menor por célula diana, cuando se emplean nanopartículas metálicas con un tamaño de partícula ≥ 80 nm comparada con la cantidad de metal requerida cuando se emplean nanopartículas metálicas con un tamaño de partícula de aproximadamente 60 nm, para producir un efecto terapéutico eficaz cuando las nanopartículas se exponen a radiaciones ionizantes (a través de radioterapia, por ejemplo).

25 Para producir un efecto terapéutico eficaz bajo radiaciones ionizantes, la utilización de nanopartículas metálicas con un tamaño de nanopartícula ≥ 80 nm requiere de una concentración metálica por célula diana que sea entre aproximadamente 2 y 7 veces inferior, en particular entre 4 y 7 veces o entre 2 y 5 veces, a la concentración metálica por célula diana requerida cuando se utilizan nanopartículas metálicas con un tamaño de nanopartícula de aproximadamente 60 nm o menos.

Tales nanopartículas metálicas parecen ser ventajosas para usos *in vivo*.

30 En terapia es particularmente ventajosa una población de nanopartículas metálicas en donde el tamaño medio más grande de una nanopartícula de la población está entre 80 y 105 nm, cuando dichas nanopartículas se exponen a radiaciones ionizantes. En particular, tales nanopartículas permiten de hecho, un Factor de Intensificación de la Dosis (DEF) mejorado. Se observó *in vitro* un efecto límite para una nanopartícula como se describe en la presente memoria cuyo tamaño más grande es preferiblemente ≥ 80 nm, e incluso más preferiblemente entre aproximadamente 80 nm y 105 nm. Tal nanopartícula muestra un área superficial reducida que permite una biocompatibilidad mejorada y en consecuencia una toxicidad reducida.

35 Una población de nanopartículas metálicas como se describe en la presente memoria permite además una eliminación reducida por el tumor. Una inyección única de una composición según la presente invención permite el efecto terapéutico requerido en el contexto de un protocolo de radiación multi fraccionado como se aplica actualmente en clínica.

40

Referencias

- 'Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement', Herold et al., *Int. J. Rad. Biol.*, 2000, 76, pp 1357-1364
- 5 - 'Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice', Meng-Ya Chang et al., *Cancer Sci.*, 2008, 99(7) pp 1479-1484
- 'Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes', B. Devika Chithrani et al., *Nano Lett.*, 2007, 7 (6), pp 1542-1550
- 10 - 'Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells', B. Devika Chithrani et al., *Nano Lett.*, 2006, 6(4), pp 662-668
- 'Enhancement of Radiation Cytotoxicity in Breast-Cancer Cells by Localized – Attachment of Gold Nanoparticles', Tao Kong et al., *Small*, 2008, 4(9), pp 1537-1543
- 15 - 'Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface', Andre E. Nel et al., *Nature Materials*, 2009, 8, pp 543-557
- 'The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice', James F Hainfeld et al., *Phys. Med. Biol.*, 2004, 49, pp N309-N315
- 'Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles' Brian L. Cushing et al., *Chem. Rev.*, 2004, 104, pp 3893-3946
- 20 - 'Folate-targeted, cationic liposome-mediated gene transfer into disseminated peritoneal tumors'; J A Reddy et al., *Gene therapy*, 2002, 9, pp 1542-1550
- 'Folate targeting of drug carriers: A mathematical model', Ketan B. Ghaghada et al., *Journal of Controlled Release*, 2005, 104, pp 113-128
- 25 - 'Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions', G. Frens, *Nature Physical Science*, 1973, 241, pp 21-22.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una población de nanopartículas de oro (Au) para preparar una composición farmacéutica para emplear en un método para modificar, alterar o destruir células humanas diana *in vivo*, seleccionadas del grupo que consiste en células benignas, células pre-malignas y células malignas, cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde el tamaño medio más grande de una nanopartícula de la población está entre aproximadamente 80 y 105 nm, y en donde la nanopartícula de oro se recubre con un recubrimiento biocompatible.
- 10 2. Composición farmacéutica que comprende una población de nanopartículas de oro para emplear en un método para modificar, alterar o destruir células humanas diana *in vivo*, seleccionadas del grupo que consiste en células benignas, células pre-malignas y células malignas, cuando dichas células se exponen a radiaciones ionizantes, en donde el tamaño medio más grande de una nanopartícula de la población está entre aproximadamente 80 y 105 nm, y en donde la nanopartícula de oro se recubre con un recubrimiento biocompatible.
- 15 3. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde el recubrimiento biocompatible es un recubrimiento no-biodegradable seleccionado del grupo que consiste en sílice, alúmina, azúcar, fosfato, silano, tiol, compuesto zwitteriónico, lípido, polímero de carbono saturado y un polímero inorgánico; o un recubrimiento biodegradable seleccionado del grupo que consiste en un polímero biológico, fosfolípido, sacárido, oligosacárido y polisacárido.
- 20 4. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10^{-6} nmoles y 10^{-3} nmoles de oro por célula diana.
5. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde la nanopartícula comprende un componente superficial que activa dianas específicas de tejidos o células biológicas.
- 25 6. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde la nanopartícula está esencialmente en forma esférica u ovoide.
7. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde dichas radiaciones ionizantes se seleccionan del grupo que consiste en Rayos-X, Rayos- γ , rayos de electrones y emisiones de radioisótopos.
- 30 8. El uso o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 7, en donde las radiaciones ionizantes son de aproximadamente 50 KeV a aproximadamente 12.000 KeV.
9. El uso o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 7, en donde las radiaciones de Rayos-X son de aproximadamente 50 KeV a 6.000 KeV.
10. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde dichas células humanas malignas son células de un tumor sólido.
- 35 11. El uso según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para emplear según la reivindicación 2, en donde la composición farmacéutica comprende además un compuesto terapéutico adicional destinado a tratar el cáncer, siendo dicho compuesto terapéutico adicional distinto de la población de nanopartículas de oro.

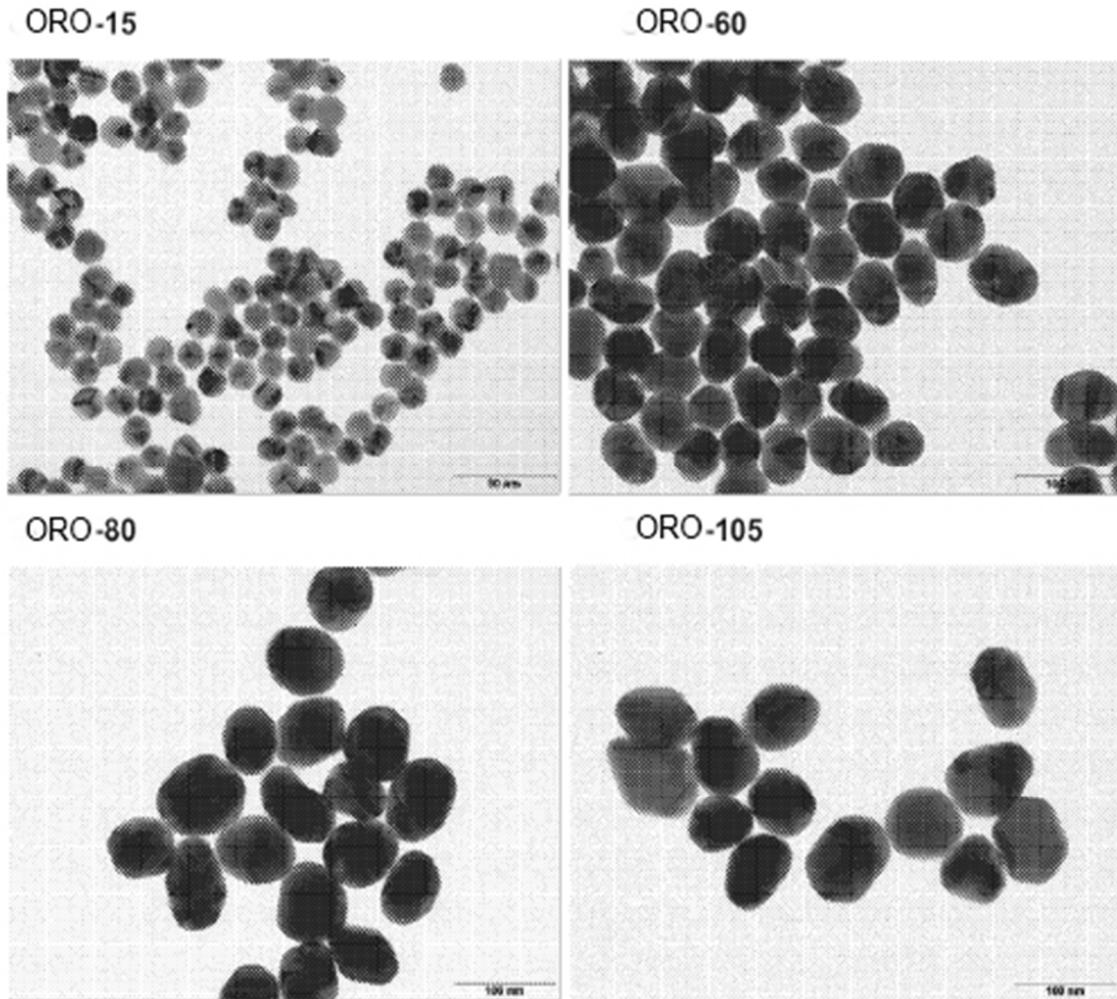


FIGURA 1A

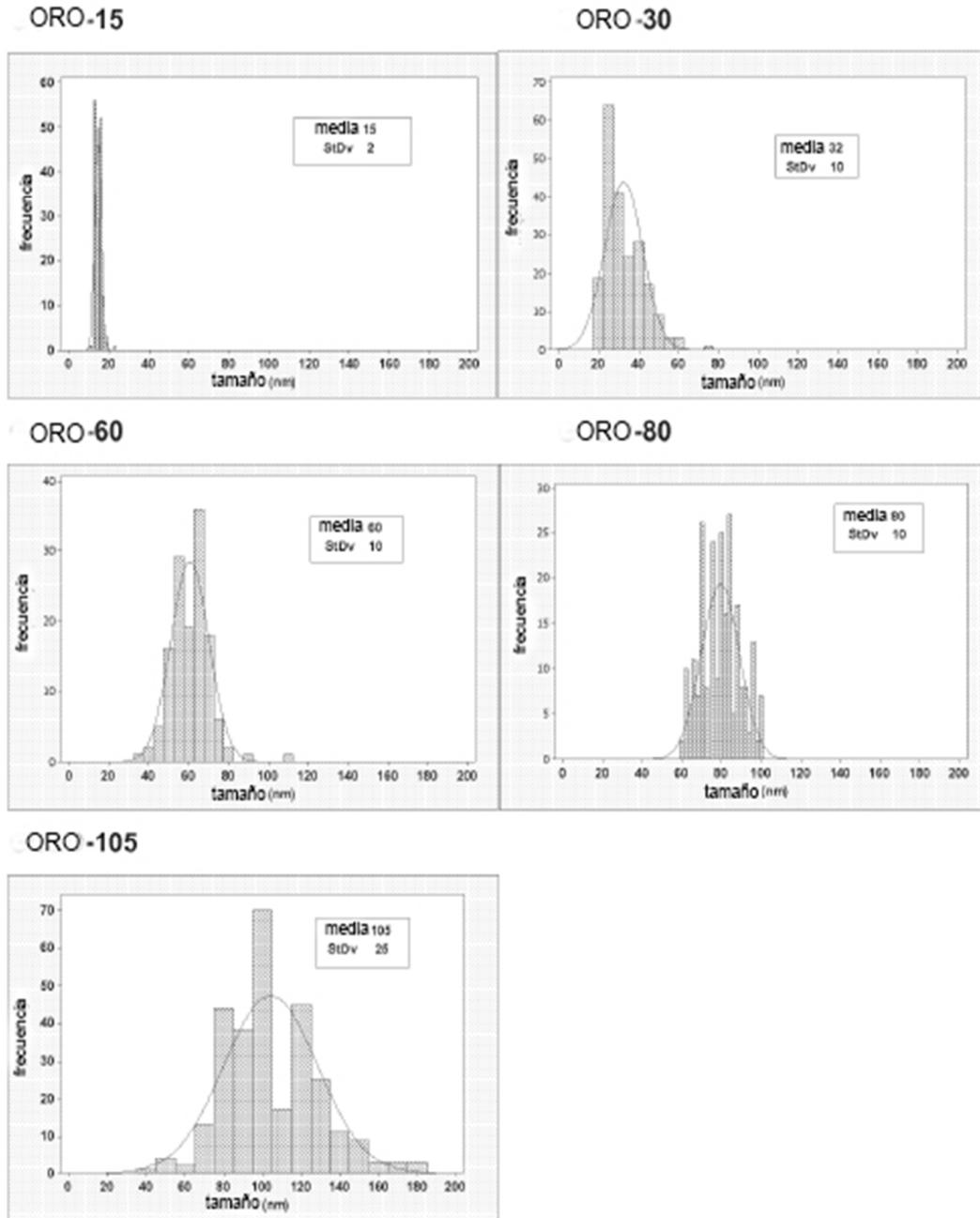
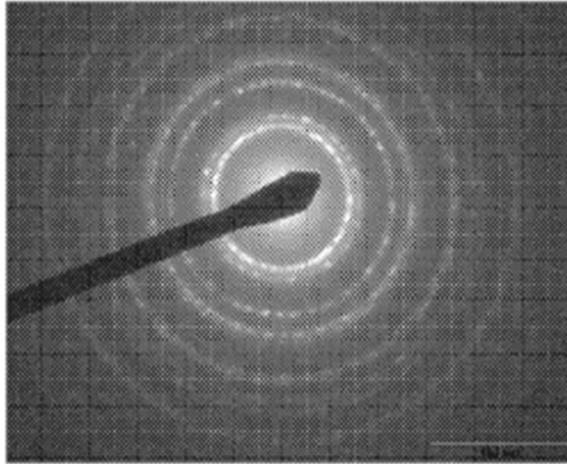


FIGURA 1B

REFERENCIA



Nanopartículas de oro ORO-X nm (X=15, 32, 60, 80, 105 nm)

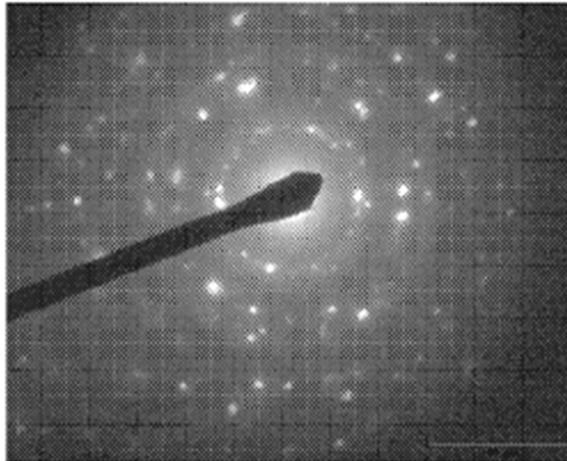


FIGURA 2A

REFERENCIA: nanopartículas de oro con estructura CFC para determinar $L\lambda$:

Diámetro (cm)		d_{hkl}		$L\lambda$
D1	1,90	d_{111}	2,354	2,236
D2	2,20	d_{200}	2,039	2,243
D3	3,10	d_{220}	1,442	2,235
D4	3,65	d_{311}	1,229	2,243
				2,239

Indexación de nanopartículas de oro del ejemplo 1:

Diámetro (cm)		$L\lambda$	d_{hkl}	Atribución
D1	1,90	2,239	2,357	d_{111}
D2	2,20	2,239	2,036	d_{200}
D3	3,20	2,239	1,400	d_{220}
D4	3,60	2,239	1,244	d_{311}
Estructura CFC de oro				

FIGURA 2B

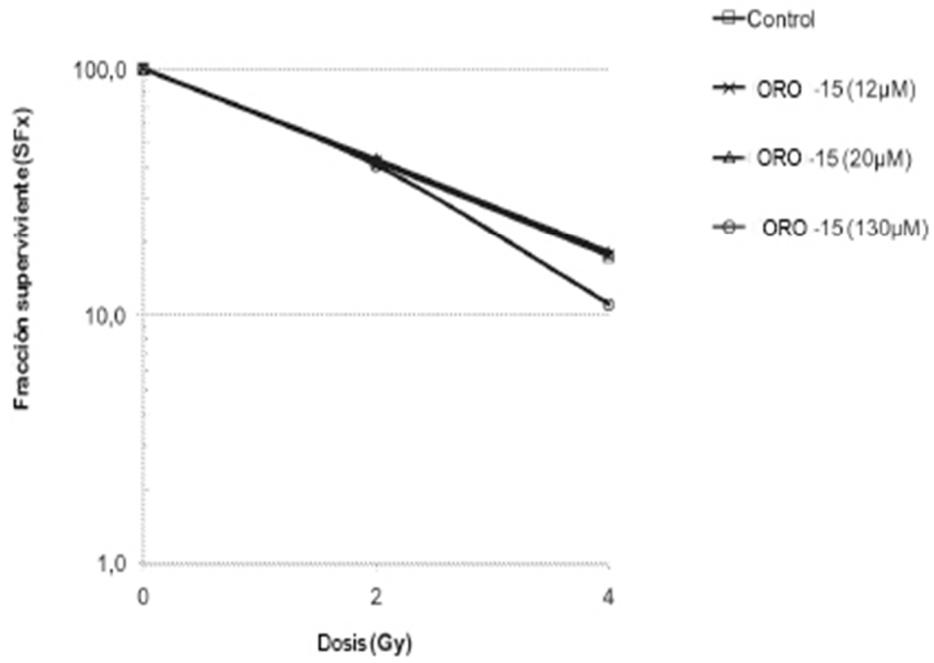


FIGURA 3A

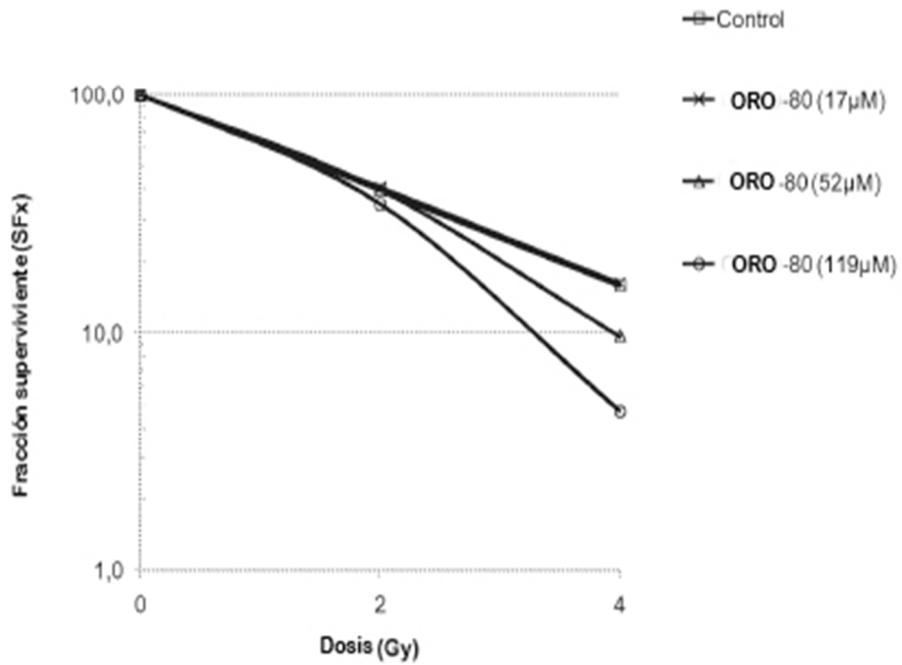


FIGURA 3B

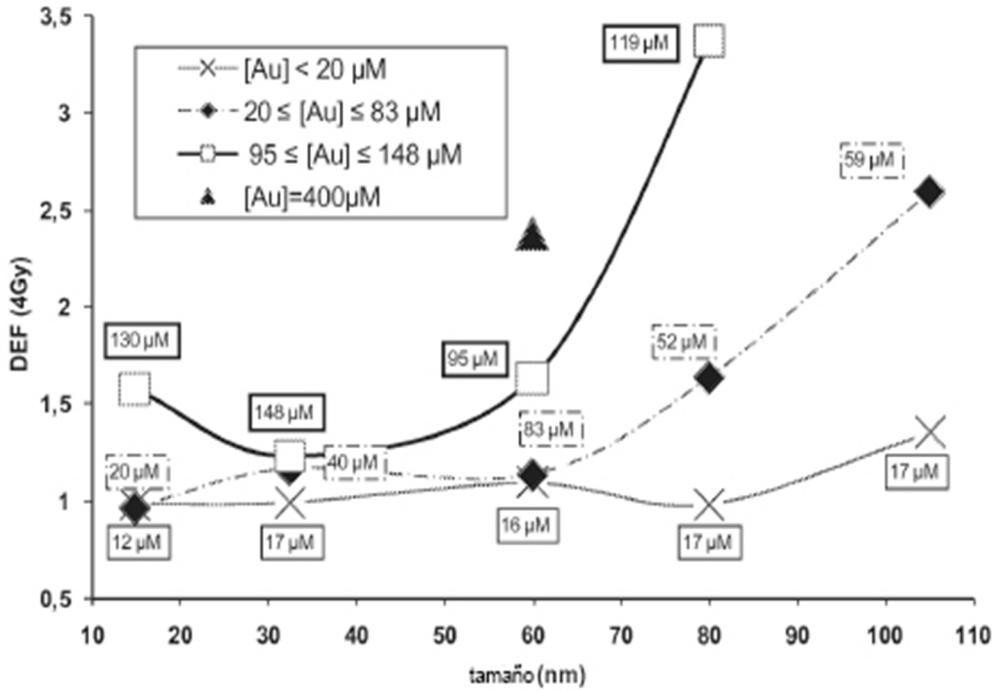


FIGURA 4A

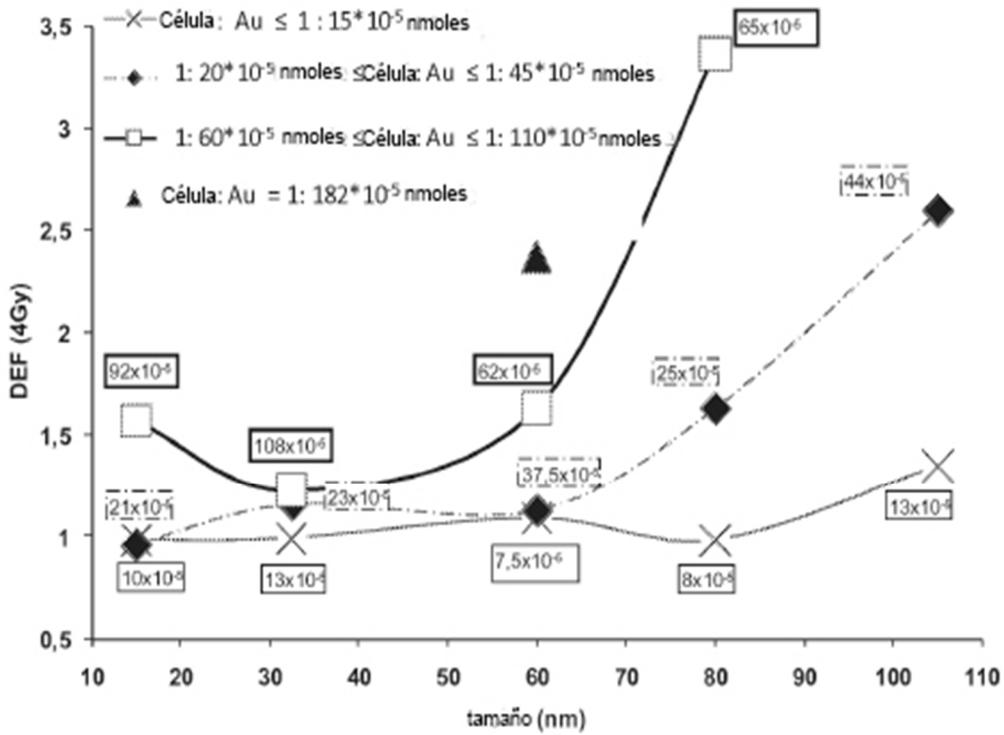


FIGURA 4B

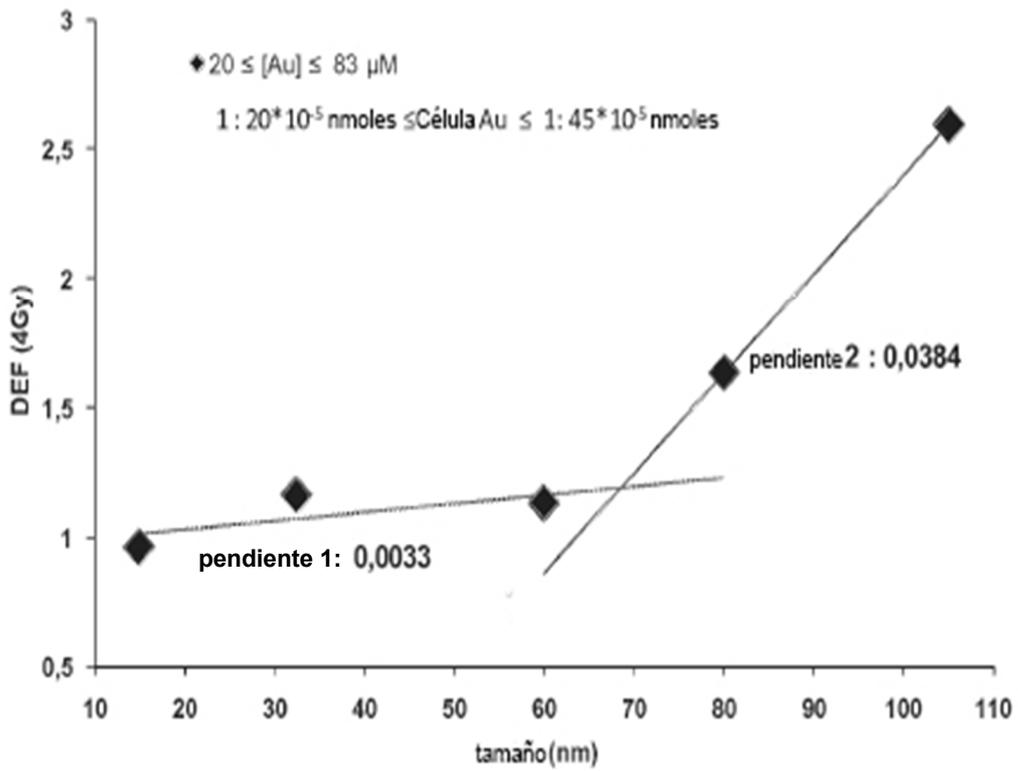
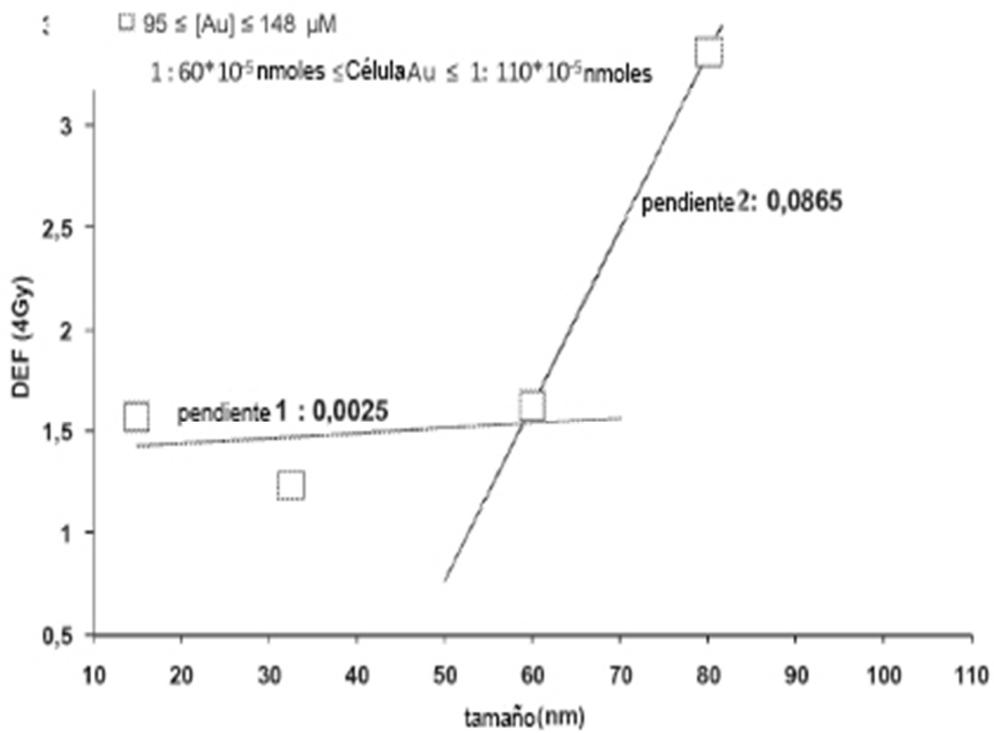


FIGURA 5A



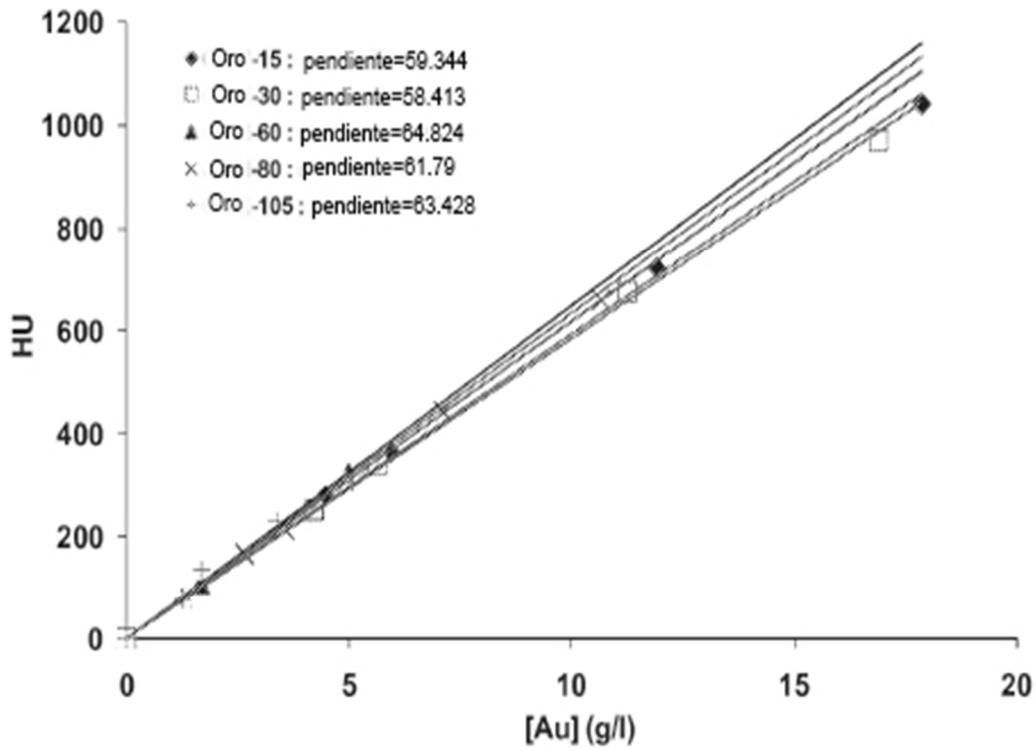
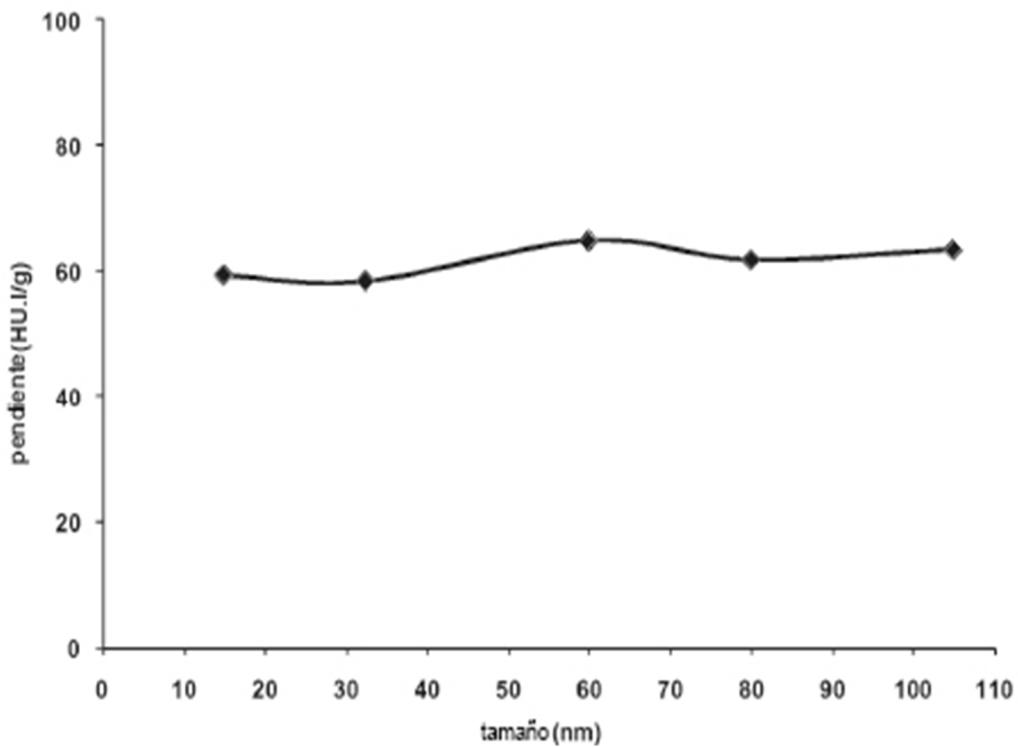


FIGURA 6A



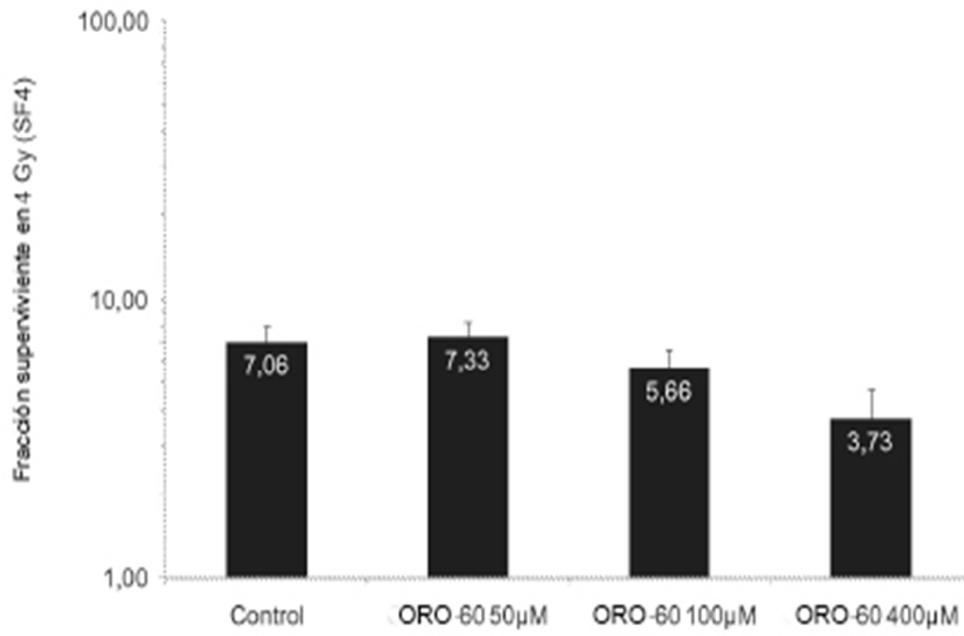


FIGURA 7A

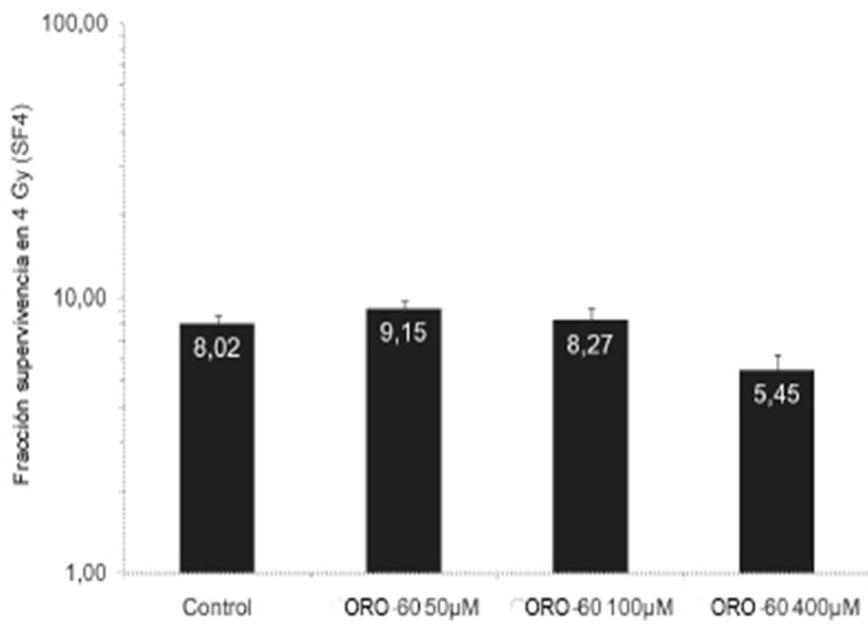


FIGURA 7B