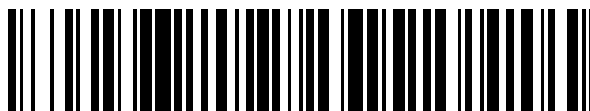


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 420**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2009 PCT/NL2009/050337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10143942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09788193 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2440247**

54 Título: **Nanofotomedicamentos destinados al tratamiento fotodinámico del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2017

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
 ROTTERDAM (50.0%)
 Dr. Molewaterplein 50
 3015 GD Rotterdam, NL y
 AMRITA VISHWA VIDYAPEETHAM UNIVERSITY
 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOYAKUTTY, MANZOOR;
 ROBINSON, DOMINIC JAMES;
 STERENBORG, HENRICUS JOHANNES
 CORNELIUS MARIA;
 KASCAKOVA, SLAVKA y
 NAIR, SHANTIKUMAR**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 627 420 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

Nanofotomedicamentos destinados al tratamiento fotodinámico del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a terapia de cáncer y a formulaciones terapéuticas para uso en el tratamiento de cáncer. En particular, la presente invención se refiere a nanomedicamentos para uso en la terapia fotodinámica del cáncer, así como a métodos para preparar dichos nanomedicamentos.

Antecedentes de la invención

10 La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad de tratamiento emergente para el tratamiento de muchos tipos de cánceres y diversas afecciones no malignas. En la PDT, la activación por luz de un fármaco fotosensibilizador crea especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como oxígeno singlete (1O_2), radicales libres o peróxidos que pueden destruir oxidativamente los compartimentos celulares incluyendo el plasma, las mitocondrias, los lisosomas y las membranas nucleares, dando como resultado daños irreversibles de las células tumorales. Bajo condiciones apropiadas, la terapia fotodinámica ofrece la ventaja de un método eficaz y selectivo para destruir tejidos enfermos sin dañar los tejidos sanos adyacentes. Sin embargo, a pesar de las ventajas de la PDT sobre los tratamientos actuales (por ejemplo, cirugía, radioterapia y quimioterapia), su aceptación clínica general como una herramienta convencional de terapia del cáncer es todavía muy baja. Esto se debe a algunas limitaciones críticas de la técnica actual de la PDT, tales como fotosensibilidad prolongada del cuerpo debido a la biodistribución inespecífica del fármaco fotosensible, baja fotoabsorción del fármaco en mejores regiones penetrantes del tejido del espectro de luz, hidrofobicidad de los fármacos PS que conduce a la agregación descontrolada en circulación y a dificultades en la administración, el fotoblanqueamiento rápido de fármacos hidrófilos, la localización inespecífica de fármacos que conduce a la falta de concentración óptima del fármaco en los sitios objetivo.

25 Dada la falta de direccionamiento eficaz de los enfoques tradicionales de la PDT, el estado de la técnica tiene y continúa desarrollando conjugados para terapia fotodinámica dirigida (el conjugado combina el fotosensibilizador con un ligando de direccionamiento, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, péptidos, ácido fólico, etc.). Es importante observar que estos enfoques están estrechamente relacionados con el desarrollo de conjugados de diagnóstico óptico destinados que incorporan pequeñas moléculas fluorescentes conjugadas a los mismos ligandos de direccionamiento que se usan en la terapia fotodinámica dirigida. Sin embargo, el estado de la PDT dirigida del estado de la técnica tiene una serie de desafíos significativos. 1) Las fotosensibilizaciones más eficaces son de naturaleza hidrófoba con solubilidad en agua inherentemente pobre y tienen una alta afinidad por ambientes lipídicos. Esto tiene dos consecuencias: Primero, cuando se inyectan conjugados fotosensibilizadores en condiciones fisiológicas, forman agregados que se unen a las proteínas plasmáticas y son eliminados del huésped por el sistema endorreticular. Esto limita la concentración efectiva de conjugado que puede alcanzarse en cualquier tejido objetivo. En segundo lugar, cuando los conjugados fotosensibilizadores interactúan con las células objetivo, su alta lipofilia promueve la captación celular no específica. Este proceso compite con el direccionamiento del receptor activo y conduce a la acumulación de conjugado en células normales que no expresan el receptor objetivo. 2) El hecho de que una única molécula fotosensibilizadora esté unida a un solo ligando de direccionamiento significa que puede haber un límite para la cantidad de fotosensibilizador que se puede incorporar en células con un número finito de receptores. Aunque se han hecho esfuerzos para unir múltiples moléculas fotosensibilizadoras (o sus precursores) a un solo ligando de direccionamiento, esto sigue siendo un problema significativo. También una propiedad importante de los fotosensibilizadores libres es que ellos mismos son destruidos por la generación de especies reactivas de oxígeno, se produce un efecto similar en los conjugados de fotosensibilizador-ligando. Este efecto limita la dosis total de oxígeno reactivo que se puede administrar al tejido. Por lo tanto, la consecución de una alta concentración de fotosensibilizador por receptor es crítica.

45 McCarthy y colaboradores (Database Chemical Abstracts: Multimodal nanoagent for the diagnosis and treatment of atherosclerosis) divulgan nanopartículas de óxido de hierro entrelazadas que se conjugan con AlexaFluor 750. El fotosensibilizador (AlexaFluor 750) se acopla a la nanopartícula después del ensamblaje de la nanopartícula.

El documento EP 1 097 935 divulga complejos de oro de clorina e_6 (un fotosensibilizador).

50 El documento WO2007/136413 divulga nanopartículas fluorescentes de óxido metálico que pueden estar enlazadas a biomoléculas y otras moléculas tales como fotosensibilizadores. Las primeras nanopartículas de óxidos metálicos se elaboran antes de que los fluorocromos estén ligados.

El documento WO2006 / 060797 está dirigido a terapia fotodinámica guiada por MRI para el cáncer. Divulga conjugados de fotosensibilizador de polímero marcado con un agente de contraste de MRI.

55 Guo y colaboradores (Amphiphilic block copolymer micelles as chlorin e_6 carriers, Life Science Journal, Acta, edición de Zhengzhou University Overseas, vol. 5, No. 1, 2008, páginas 1-5) divulga micelas copoliméricas en bloque como portadoras de clorina e_6 . Guo elabora primero las micelas, después de lo cual se introduce la clorina e_6 . La clorina e_6 está libre en la micela.

- Hamblin y colaboradores: (Pegylation of a chlorin e_6 polymer conjugate increases tumor targeting of photosensitizer, Cancer Research, Vol 61, No 19, (2001) páginas 7155-7162) divulga la pegilación de polímeros conjugados con clorina e_6 .
- 5 Bachor y colaboradores (Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e_6 -conjugated microspheres, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, No 4 (1991), páginas 1580-1584) enseñan el uso de clorina e_6 Microesferas conjugadas.
- Bachor y colaboradores: (Free and conjugated chlorin e_6 in the photodynamic therapy of human bladder carcinoma cells, Journal of Urology Vol 146, No 6 (1991) páginas 1654-1658) muestran un estudio entre clorina e_6 libre y conjugada con microesferas.
- 10 Dekker y colaboradores (Lethal photosensitisation of Staphylococcus aureus using a tin chlorin e_6 -gold nanoparticle, Photodiagnosis and photodynamic therapy: EPPM-1 Abstracts Vol. 5, No 1, (2008) páginas 62-96) divulgan nanopartículas de oro con clorina e_6 en las que la clorina e_6 está acoplada a una partícula ya elaborada de oro a través de un enlazador de glutatona.
- 15 Tokuoka y colaboradores (Anticancer effect of dye-sensitized TiO₂ nanocrystals by polychromatic visible light irradiation, Chemistry Letters, Vol. 35, No. 5, 2006, páginas 496-497) muestran efectos anticancerígenos de nanocristales de TiO₂ sensibilizados con colorante.
- El documento WO2008/130181 está dirigido a polímeros conjugados fotosensibilizadores para terapia fotodinámica.
- 20 Schmidt-Erfurth y colaboradores (Photodynamic Therapy in ocular vascular disease, Laser Physics, Vol. 8, No 1 (1998) páginas 191-198) divulgan LDL conjugado a fotosensibilizadores para uso en terapia fotodinámica.
- El documento WO95/27481 divulga composiciones líquidas de liberación para sistemas de liberación sostenida que pueden comprender nanopartículas. Divulga que el agente activo puede ser distribuido a través de la nanoesfera.
- 25 Pegaz y colaboradores (Encapsulation of porphyrins and chlorins in biodegradable nanoparticles: The effect of dye lipophilicity on the extravasation and the photothrombic activity. A comparative study. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Vol. 80, No. 1 páginas 19-27) describen la encapsulación de porfirinas y clorinas en nanopartículas biodegradables para terapia fotodinámica.
- Bachor y colaboradores (Mechanism of photosensitization by microsphere-bound chlorin e_6 in human bladder carcinoma cells, Cancer Research Vol. 51, No 15, (1991), páginas 4410-4414) divulgan clorina e_6 unida a microesferas en células de carcinoma de vejiga. La clorina e_6 se conjuga CON microesferas de poliestireno ya elaboradas.
- 30 Zhu Zhi y colaboradores (Regulation of singlet oxygen generation using singlewalled carbon nanotubes, Journal of the American Chemical Society, Vol. 130, No 33 (2008), páginas 10856-10857) describen el uso de nanotubos para la generación de oxígeno singlete. Los nanotubos elaborados se acoplan a un fotosensibilizador clorina e_6 a través de un aptámero.
- 35 Sheen y colaboradores (Apoptotic mechanisms in targeted neuronal cell death by chromophore-activated photolysis, Experimental Neurology, Vol. 130, No 1 (1994) páginas 67-81) divulgan nanoesferas que portan clorina e_6 que se usan en células de neuroblastoma. La clorina e_6 se conjugó con nanoesferas de látex ya elaboradas.
- El documento WO2008/133598 divulga la formación de glutatión entrecruzado sobre nanoestructuras. Se recubrió una capa de glutatión entrecruzado sobre una superficie de una nanoestructura de base metálica.
- 40 El documento WO2009/077908 se refiere a partículas coloidales que comprenden aniones cíclicos multivalentes. Las partículas se forman a través de fuerzas electrostáticas.
- Sumario de la invención
- En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de una nanopartícula que contiene un fotosensibilizador adecuado para su uso en terapia fotodinámica que comprende:
- 45 - proporcionar una molécula precursora de nanopartículas;
- acoplar un fotosensibilizador a dicha molécula precursora de la nanopartícula para proporcionar un precursor de nanopartícula conjugado con un fotosensibilizador, y
- formar una nanopartícula a partir de dicho precursor de nanopartícula conjugado con fotosensibilizador mediante precipitación en solución o autoensamblaje de dicho precursor de nanopartículas.

En una realización altamente preferida, la presente invención proporciona un método para la producción de una nanopartícula que contiene un fotosensibilizador adecuado para uso en terapia fotodinámica dirigida asistida por formación de imágenes moleculares, que comprende:

- proporcionar una molécula precursora de nanopartículas;
- 5 - acoplar un fotosensibilizador a dicha molécula precursora de nanopartículas para proporcionar un precursor de nanopartículas conjugado con fotosensibilizador,
- incorporar un agente de contraste magnético y/u óptico al conjugado precursor de fotosensibilizador-nanopartícula, y
- 10 - formar una nanopartícula a partir de dicha mezcla de precursores de fotosensibilizador-nanopartículas que contiene un agente de contraste magnético y/u óptico mediante precipitación en solución o autoensamblaje molecular.

En una realización preferida de dicho método, dichas nanopartículas están formadas a partir de un material seleccionado del grupo que consiste en sulfato metálico, fosfato metálico, óxido metálico, quitosano, carboximetilquitosano (CMC), alcohol polivinílico (PVA), poliestireno (PS) Polivinilpirrolidona (PVP), ácido poliláctico (PLA), polietilenimina (PEI), poli (ácido láctico co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polietilenglicol (PEG) y combinaciones de los mismos.

En otra realización preferida de dicho método, dicho óxido metálico es sílice, dicha molécula precursora es un ortosílice y dicha nanopartícula está formada por un proceso sol-gel para la formación de polvos de silicato por hidrólisis y condensación bajo condiciones de pH básico y bajo sonicación para formar nanopartículas de sílice coloidal.

En aún otra realización preferida de dicho método, dicho fotosensibilizador se selecciona de clorina e_6 (Ce_6), meso-tetra (3-hidroxifenil) clorina (m-THPC), anillo A del monoácido derivado de benzoporfirina (BPD o verteporfina), fotofrina, Temoporfina (Foscan®), rosa de Bengala, ftalocianina metálica y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula que contiene un fotosensibilizador que se puede obtener por un método según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una nanopartícula que contiene un fotosensibilizador, que comprende un fotosensibilizador unido covalentemente a través de al menos una parte de dicha nanopartícula al material de la matriz de la nanopartícula e incorporado en él como una mezcla de moléculas monoméricas y agregadas, en donde la relación de la absorción de la banda Q con respecto a la absorción de la banda Soret de dichas nanopartículas tiene un valor de al menos 0,3.

En una realización preferida de aspectos de la invención, dicha nanopartícula está formada a partir de un material seleccionado del grupo que consiste en sulfato metálico, fosfato metálico, óxido metálico, quitosano, polivinilpirrolidona (PVP), ácido poliláctico (PLA), polietilenimina (PEI), poli (ácido láctico-coglicólico) (PLGA), y combinaciones de los mismos.

35 En una realización altamente preferida de la invención, dicha nanopartícula se forma a partir de un óxido metálico, y preferiblemente dicho óxido metálico es sílice.

En aún otra realización preferida de una nanopartícula según la presente invención, dicho fotosensibilizador se selecciona entre clorina e_6 (Ce_6), meso-tetra(3-hidroxifenil)clorina (m-THPC), anillo A del monoácido derivado de benzoporfirina (BPD O verteporfina), fotofrina, temoporfina (Foscan®), rosa de Bengala, ftalocianina metálica y combinaciones de los mismos.

En aún otra realización preferida de una nanopartícula según la presente invención, dicha nanopartícula está dopada con un agente de contraste óptico y/o una funcionalidad de contraste magnético.

En aún otra realización preferida, el agente de contraste óptico son puntos cuánticos luminiscentes de ZnS dopados con Mn, Cu-Al o Cu-halógeno.

45 En aún otra realización preferida, la funcionalidad de contraste magnético se proporciona dopando el nanofotomedicamento con Gd^{3+} , Fe^{3+} o Mn^{2+} .

En incluso otra realización preferida, dicha nanopartícula comprende un ligando direccionado contra el cáncer conectado a la superficie más externa a través de un enlace covalente. Preferiblemente, el ligando direccionado contra el cáncer es un octreótido.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inyectable o composición para administración oral que comprende las nanopartículas según la presente invención como se ha descrito anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para matar células cancerosas por tratamiento con PDT, que comprende poner en contacto dichas células cancerígenas con una nanopartícula de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente e irradiar dichas nanopartículas con una cantidad terapéuticamente eficaz de luz para provocar la emisión de oxígeno singlete a partir de dichas nanopartículas.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para matar células cancerosas mediante tratamiento con PDT asistido por imágenes, que comprende poner en contacto dichas células de cáncer con una nanopartícula de acuerdo con la presente invención como se ha descrito anteriormente e irradiar dichas nanopartículas con una cantidad terapéuticamente eficaz de luz para provocar la emisión de oxígeno singlete a partir de dichas nanopartículas, donde la nanopartícula está dopada con un agente de contraste óptico y/o un agente de contraste magnético y en donde la dirección de dicha irradiación es guiada por técnicas de formación de imágenes que utilizan el agente de contraste óptico o magnético como marcador para indicar la localización, tamaño y propagación de las células cancerosas.

Descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 1: Micrografía electrónica de transmisión del nanofotomedicamento a base de sílice de tamaño 90-100 nm.

La Figura 2 muestra los resultados del experimento descrito en los Ejemplos 1-3: Espectros de excitación de fluorescencia del nanofotomedicamento a base de Clorina e_6 adsorbida sobre sílice que muestran un aumento sistemático en la absorción de NPM-1, NPM-2 y NPM-3 a 654 nm debido a una condición de procesamiento específica, en comparación con la del fotomedicamento libre.

- 20 La Figura 3 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 4: Espectros de excitación de fotoluminiscencia del nanofotomedicamento basados en m-THPC adsorbido sobre sílice que muestra una modificación completa de los espectros de excitación que conduce a un aumento de ~ 6 veces en la banda de absorción del rojo en comparación con aquella de m-THPC libre.

- 25 La Figura 4 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 5: Las propiedades de fotodegradación del nanofotomedicamento se comparan con clorina e_6 libre que tiene casi la misma intensidad de fluorescencia inicial. Ce_6 libre, mostró una propiedad de fotoblanqueamiento muy rápida por el oxígeno singlete producido durante la fotosensibilización, mientras que el NPM mostró características de blanqueo no lineales completamente diferentes que dieron lugar a una fotoestabilidad prolongada del fármaco incluso después de 10 J de irradiación.

- 30 La Figura 5 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 6: Imagen microscópica confocal del fotoblanqueamiento rápido de la clorina e_6 libre dentro de las células cancerosas bajo irradiación con láser (405 nm, 30 s, panel izquierdo), mientras que en las células tratadas con el nanofotomedicamento la fotoactividad del fármaco se muestra aún después de irradiación prolongada (360 s, panel derecho).

- 35 La Figura 6 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 7: a) difracción de rayos X, b) espectros de fotoluminiscencia (PL) y c) fotografía digital que muestra la emisión de fluorescencia de nanofotomedicamentos dopados con QD de ZnS: Mn.

La Figura 7 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 10: Datos del magnetómetro de la muestra en vibración que muestra la propiedad paramagnética del nanofotomedicamento el nanofotomedicamento dopado con Gd^{3+} , adecuada para la obtención de imágenes por MRI en comparación con la propiedad diamagnética del fotomedicamento libre (Ce_6).

- 40 La Figura 8 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 10: Formación de imágenes fantasma por RMI de nanofotomedicamento (NPM) de diferente concentración con referencia al agua y al Ce_6 libre.

La Figura 9 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 11: Imagen microscópica confocal que muestra una captación intracelular eficiente del nanofotomedicamento conjugado con el péptido por células cancerosas +ve receptoras sst2+ (K562).

- 45 La Figura 10 muestra los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 11: Los datos de terapia fotodinámica de células cancerosas que muestran una muerte celular mejorada (baja viabilidad celular) en células K562 tratadas con nanofotomedicamentos comparado con clorina e_6 libre de la misma concentración y nanopartículas de control. La Figura 10 muestra que, dependiendo de la absorbancia a 654 nm, el efecto de la PDT de los NPM es mejor.

Descripción detallada de la invención

- 50 Definiciones

El término "nanopartícula" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una partícula cristalina o primaria que mide aproximadamente 20-500 nm, preferiblemente 50-200 nm, lo más preferiblemente alrededor de 100 nm en tamaño. La nanopartícula puede ser una nanopartícula orgánica o inorgánica que incluye una nanopartícula polimérica. Las partículas se pueden producir en forma de polvos secos o dispersiones líquidas. Generalmente, las

nanopartículas en forma de productos de mayor valor agregado requieren procesamiento adicional para proporcionar suspensiones, películas o dispositivos. En la presente invención se prevé la aplicación como dispositivo. Las nanopartículas pueden ser sólidas o porosas y pueden comprender un núcleo interno rodeado por una o más capas continuas o semicontinuas o pueden comprender una sola partícula monolítica. Tanto, el núcleo como la capa o capas pueden ser orgánicos, inorgánicos o poliméricos. Materiales nanoparticulados adecuados para la fabricación de la nanopartícula son óxidos metálicos simples, tales como sílice (SiO₂), óxido de titanio (TiO₂), alúmina (Al₂O₃), óxido de hierro (Fe₃O₄, Fe₂O₃), óxido de cinc (ZnO), óxido de cerio (CeO₂) y óxido de zirconio (ZrO₂). También son adecuados óxidos mixtos tales como óxido de indio-estaño (In₂O₃-SnO₂ o ITO) y óxido de antimonio-estaño (ATO), silicatos (silicatos de aluminio y zirconio) y titanatos (titanato de bario (BaTiO₃)). Otros tipos de nanopartículas, incluyendo diversos óxidos complejos, semiconductores, cerámicas sin óxido (por ejemplo, carburo de tungsteno) y metales son también adecuados en ciertas realizaciones. Con la excepción de óxidos semiconductores, tales como TiO₂ e ITO, nanocristales semiconductores (a menudo llamados puntos cuánticos). Tecnología adicional para la producción de nanopartículas implica el uso de dendrímeros (polímeros sintéticos altamente ramificados) u otros polímeros. Los fotosensibilizadores están típicamente unidos a la superficie del dendrímero o colocados en los espacios vacíos dentro de ellos para direccionamiento al sitio y suministro controlado, o una combinación de direccionamiento y detección. Las nanopartículas pueden ser sintetizadas adecuadamente por síntesis coloidal y pueden adoptar la forma de cristales coloidales. Los precursores de nanopartículas adecuados incluyen monómeros polimerizables que tienen preferiblemente 2, preferiblemente más de 2, tales como 3, 4 o 5 posiciones para la unión intermolecular, para formar una red de precursores interconectados, que se agregan para formar una nanopartícula.

La expresión "dispositivo nanoportador", como se usa en la presente memoria, se refiere a la composición de la invención en forma de una nanopartícula, en la que la partícula sirve como un vehículo para compuestos tales como fotosensibilizadores, agentes opcionales de formación de imágenes y ligandos de direccionamiento.

El término "fotosensibilizador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a compuestos tales como clorina e₆ (Ce₆), m-THPC, etc.

El término "nanofotomedicamento" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un fotosensibilizador complejo con las nanopartículas.

El término "nanofotomedicamento dopado" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un nanofotomedicamento dopado con un agente de contraste de MR y/o agente de contraste óptico.

El término "dopado" tal como se utiliza en la presente memoria, significa que se ha añadido intencionalmente una pequeña cantidad (aproximadamente 1-15%) de otra sustancia (en este caso, un agente de contraste óptico y/o un agente de contraste magnético) intencionalmente en el cristal de nanopartículas.

El término "conjugado de nanofotomedicamento", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una nanofotomedicamento conjugada con un ligando de direccionamiento.

El término "nanofotomedicamento-conjugado dopado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un nanofotomedicamento dopado conjugado con un ligando de direccionamiento y dopado con un agente de contraste de resonancia magnética (MR) y/o un agente de contraste óptico.

Los presentes inventores han descubierto una formulación de nanofotomedicamento que proporciona una mejor eficacia en el tratamiento con PDT. La formulación del nanofotomedicamento de la invención comprende una nanopartícula basada en nanocristales de sulfato metálico, fosfato metálico, óxido metálico o a base de quitosano, polivinilpirrolidona (PVP), ácido poliláctico (PLA), polietilenimina (PEI), poli (ácido láctico coglicólico) (PLGA), u otro polímero adecuado y combinaciones de los mismos, tal como una partícula que tiene un núcleo de óxido metálico y una capa de polímero, o un núcleo de polímero que tiene una capa de óxido metálico, o cualquier otra combinación de lo anterior, que incluye una construcción cerámica, núcleo o capa, en donde dichas nanopartículas, o capa o núcleo de la misma, están dopadas con moléculas fotosensibilizadoras, y en donde dichas moléculas fotosensibilizadoras se distribuyen en dicho material de nanopartículas en un estado cuasiagregado.

El término "estado cuasiagregado" se usa en la presente memoria para indicar que los fotosensibilizadores están presentes en el nanoportador (nanopartícula) a diferentes niveles de agregación, es decir, tanto en forma de agregados, así como en la forma de fotosensibilizador libre (unidades monoméricas).

En la presente invención, un estado único del fármaco fotosensibilizador dentro de nanopartículas mediante un estado semi (cuasi) agregado. Este estado puede ser definido mediante la absorbancia mejorada del fotosensibilizador en la región de la banda Q del espectro UV-Vis como se describe en la presente memoria, comparado con su absorbancia en la banda de Soret. Más específicamente, la relación de la absorbancia de la banda Q con respecto a la banda Soret, Q/S para el estado semiagregado (estabilizado) es de al menos 0,3.

La banda Soret es la absorbancia principal de cualquier sensibilizador en su forma monomérica, pero está en la región azul, en donde la penetración del tejido es baja. La banda Q es una banda satélite en la región roja de NIR (que tiene una mejor penetración del tejido) pero siempre una menor absorbancia. Típicamente, Q/S es

aproximadamente 0,05 para los monómeros.

En la presente invención, se consigue una absorción de banda Q más alta controlando el grado de aminación (grado de enlazamiento) de la molécula sensibilizadora con la matriz de nanopartículas. Por ejemplo, como se explica con más detalle en los Ejemplos siguientes, NPM-1, es menos aminado que NPM-2 que a su vez es menos aminado que NPM-3. Como se presenta en los ejemplos de estos NPM específicos, dependiendo de la concentración de APTS y TEOS y otros parámetros de reacción, es posible obtener NPM de diferentes niveles de absorción en la banda Q a 654 nm controlando la cantidad de grupos carboxilo aminados de Ce_6 (véase la Figura 2, NPM1-2 y 3 se refiere a diferentes niveles de absorbancia a 654 nm). Por ejemplo, NPM-1 tiene un valor Q/S de aproximadamente 0,3, NPM-2 tiene un valor Q/S de aproximadamente 0,5, NPM-3 tiene un valor Q/S de aproximadamente 0,7 y NPM-4 tiene un valor Q/S de aproximadamente 1 (el máximo, donde se maximiza la absorbancia de la banda Q).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a nanopartículas de sulfatos metálicos, fosfatos metálicos o (preferiblemente) óxidos metálicos o nanopartículas poliméricas que comprenden un fármaco fotosensibilizador, teniendo dichas nanopartículas un valor Q/S de al menos 0,3. Este valor es independiente del pico espectral máximo (la banda Q que tiene su máximo en cualquier lugar entre aproximadamente 600-900 nm y la banda S que tiene su máximo en cualquier lugar entre 350-500 nm).

Los inventores han encontrado que una nanopartícula de este tipo proporciona, entre otros, una fotoestabilidad altamente mejorada.

En realizaciones preferidas, el nanocrystal es no tóxico y adecuadamente luminiscente.

A la superficie externa de esta arquitectura compuesta se conectan preferiblemente ligandos destinados al cáncer.

En otra realización de la presente invención, este conjugado de ligando de direccionamiento fotosensibilizador-nanopartícula supera, entre otros, los problemas del estado de la técnica de 1) agregación/lipofilia de fotosensibilizadores; 2) concentraciones bajas de fotosensibilizador por ligando de direccionamiento; 3) baja absorción del fotosensibilizador en la región roja del espectro visible; 4) acumulación no específica de los fotosensibilizadores; 5) agregación descontrolada de las moléculas de fotosensibilizadores en el torrente sanguíneo; 6) dificultades de dosimetría usando propiedades de fluorescencia del fotosensibilizador propiamente dicho; y 7) carencia de dosimetría no invasiva guiada por imágenes moleculares y estimación farmacocinética.

La química superficial del conjugado de nanopartículas es tal que se evita la agregación en entornos fisiológicos, que los conjugados no son secuestrados por el sistema endorreticular y que se minimiza el direccionamiento no específico de células normales. También se encontró que es posible cargar concentraciones (muy) altas de fotosensibilizador dentro de las nanopartículas para formar un estado cuasiagregado. La cantidad de fotosensibilizador dentro de las nanopartículas es adecuada.

A diferencia del fotosensibilizador libre en estado agregado, las moléculas fotosensibilizadoras en estado cuasi-agregado absorben la luz eficientemente, lo que da como resultado una generación eficaz de especies reactivas de oxígeno. Este resultado fue inesperado y puede explicarse por la conformación específica del fotosensibilizador dentro de la nanopartícula.

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el proceso de fotosensibilización dentro de la nanopartícula conduce a la monomerización controlada *in situ* del fármaco y por tanto a la liberación controlada de oxígeno singlete durante períodos de tiempo prolongados.

Además del componente fotodinámico de los conjugados de nanopartículas, las composiciones de la presente invención pueden adicionalmente incorporar agentes de contraste ópticos en (el núcleo o capa de la) nanopartícula. Los agentes adecuados de contraste ópticos incluyen marcadores luminiscentes tales como los QD ZnS: Mn^{2+} , marcadores fluorescentes tales como verde de indocianina (ICG) y colorantes ópticos tales como azul de metileno (MB). Estos marcadores permiten imágenes ópticas guiadas, suministro local de fármacos que proporciona una mejora significativa de la eficacia terapéutica para ciertas formas de cáncer. La cantidad de agentes de contraste óptico en las nanopartículas es adecuadamente aproximadamente de 0,0001-15% en peso, preferiblemente de 0,0005-5% en peso con base en el peso total de la nanopartícula dopada.

Además del componente fotodinámico de los conjugados de nanopartículas, las composiciones de la presente invención pueden adicionalmente incorporar agentes de contraste magnético en (el núcleo o capa de la) nanopartícula. Esto permite realizar imágenes de resonancia magnética que proporcionan una ventaja significativa en la determinación de la farmacocinética sistémica de los conjugados en aplicaciones clínicas en las que la penetración de luz limita la determinación óptica de su destino. La cantidad de agentes de contraste magnético es adecuadamente aproximadamente de 0,0001-15% en peso, preferiblemente de 0,0005-5% en peso con base en el peso total de la nanopartícula dopada.

Tal como se describió anteriormente, la presente invención conduce a mejoras significativas en las limitaciones actuales de los fármacos fotosensibilizadores y la PDT. Estas mejoras se deben a la naturaleza específica de dicha formulación de nanofotomedicamentos. Una de las principales ventajas de esta nueva nanoformulación, en

comparación con el fármaco libre convencional, es que las moléculas fotosensibles están complejadas con el dispositivo portador de una forma cuasiagregada, una etapa entre monómeros y moléculas agregadas, es decir, cuando ambos monómeros y moléculas agregadas coexisten. Generalmente, en solución o en forma de polvo, las moléculas individuales de colorante fotosensible (monómeros) tienden a agregarse, debido a las fuerzas de atracción intermoleculares de tipo Van der Waals. Esta agregación es un obstáculo crítico en la aplicación efectiva de la PDT porque la eficacia de fluorescencia y el rendimiento de oxígeno singlete del fármaco se reduce significativamente en el estado agregado de la molécula.

La agregación de fármacos fotosensibilizadores determinada por el nivel de interacciones intermoleculares es por lo tanto una función de la concentración de moléculas en un medio disolvente. La mayoría de los fotofármacos usados en PDT son de naturaleza hidrófoba y por lo tanto tienden a agregarse bajo condiciones fisiológicas. Por lo tanto, cuando se usan fármacos libres, sólo se puede usar una concentración muy baja para mantener la monomericidad de las fotomoléculas en circulación. Por otra parte, la forma completamente monomérica del fármaco también tiene las desventajas de una baja absorción de luz roja que penetra a través del tejido. Además, las unidades monoméricas sufren un fotoblanqueamiento rápido que conduce a la terminación prematura del tratamiento debido al hecho de que las concentraciones de las fotomoléculas caen por debajo de los niveles efectivos.

Se ha descubierto ahora que puede lograrse un equilibrio entre la monomerización completa y la agregación y que esto proporciona una aplicación mejorada y prolongada de la PDT.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una complejación controlada de las moléculas de fotofármaco con una matriz de dispositivo nanoportador (una matriz de nanopartículas). Esto se consigue proporcionando un dispositivo nanoportador con grupos funcionales que pueden unirse covalentemente a moléculas de fotofármaco individuales como unidades monoméricas, así como a especies cuasiagregadas de tal manera que las unidades monoméricas coexistan con especies agregadas separadas por los grupos funcionales en la matriz de nanopartículas. Una manera adecuada en la que esto se puede conseguir es preparar una nanopartícula a partir de precursores de nanopartículas conjugados con fotosensibilizador. En la arquitectura que se consigue de este modo, las unidades monoméricas al iniciar la irradiación con láser comienzan a liberar especies de oxígeno singlete y parte del oxígeno singlete desintegra activamente las agrupaciones cuasiagregadas de moléculas de fotofármaco dando lugar a nuevas unidades monoméricas. En consecuencia, habrá un suministro continuo de unidades monoméricas fotoactivas de larga duración de terapia con láser. Más importante aún, la formulación de nanopartículas de la presente invención es fisicoquímicamente estable en estado sólido (en polvo) o en medio acuoso/bioquímico y por lo tanto las propiedades fotofísicas permanecen ampliamente inalteradas en condiciones fisiológicas. Esto tiene la ventaja de que la agregación del fármaco en la sangre y los problemas farmacocinéticos asociados de los fármacos están ausentes.

Otra ventaja de la presente invención es que la arquitectura única de los nanofotomedicamentos y la complejación del fotofármaco conduce a una mejora significativa de la fotoabsorción del fotofármaco en la región roja e infrarroja cercana del espectro de luz visible donde la penetración de tejido de a radiación luminosa es más alta. Esta propiedad tiene una importancia significativa en la mejora de la eficacia de la fototerapia porque la mayoría de las moléculas libres de fotofármaco tienen una absorción mínima en la región roja (es decir, la banda Q) en comparación con la región ultravioleta o azul (banda Soret) del espectro electromagnético. Esto limita el uso de fotofármacos libres, ya que los fármacos necesitan ser fotosensibilizados en toda la región interior del tumor usando radiación luminosa con alta penetración del tejido, tal como luz roja. Se requiere por lo tanto una mejora en la propiedad de absorción del fotofármaco en la región roja, es decir, la banda Q. Por consiguiente, la presente invención proporciona una nanoformulación de fotofármacos en la que la fotoabsorción es significativamente más alta en la banda Q, muchas veces tan alta como la de la banda Soret. Esta propiedad de absorción mejorada es única para dicha nanoformulación lograda por medio de una interacción supramolecular controlada de las moléculas de fármaco cuasiagregadas con la del dispositivo nanoportador.

Incluso otra característica importante de la presente invención está relacionada con la mayor estabilidad del fotomedicamento dentro del dispositivo nanoportador que resulta en la liberación prolongada de oxígeno singlete citotóxico. Generalmente, los fotofármacos libres monoméricos, particularmente las moléculas hidrófilas como la clorina e_6 , sufren un fotoblanqueamiento rápido debido al ataque del oxígeno singlete producido por la propia molécula. Esto limita la disponibilidad de concentraciones suficientes de fotofármacos en el sitio enfermo y por lo tanto limita la eficacia terapéutica del fármaco en el daño del cáncer. La modificación directa de las moléculas para estabilización frente al fotoblanqueamiento puede afectar el rendimiento cuántico de la producción de oxígeno singlete y no es deseable. Por lo tanto, es importante preparar una formulación de fotofármacos en la que se mantenga el rendimiento de oxígeno singlete y que al mismo tiempo presente menos fotoblanqueamiento.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una formulación de nanofotomedicamento en la que las unidades monoméricas del fármaco no están expuestas al efecto blanqueador de la luz láser completa. En lugar de ello, el fotofármaco se compleja junto con la matriz nanoportadora como una mezcla estable de unidades monoméricas y unidades cuasiagregadas, de tal manera que tras la irradiación con láser el oxígeno singlete producido por los monómeros provoca la desagregación de unidades cuasiagregadas para proporcionar un suministro continuo de concentración citotóxica de oxígeno singlete incluso durante largos periodos de irradiación y/o alta fotodosis.

Otra ventaja adicional de ciertas realizaciones de la presente invención es la capacidad de los nanofotomedicamentos para proporcionar imágenes de contraste magnético y óptico del sitio enfermo antes o durante la fototerapia. La radioterapia guiada por imágenes es un área emergente en la práctica clínica donde se detecta la ubicación exacta, el tamaño y la propagación (angiogénesis/metástasis) del cáncer y se utiliza para dirigir la terapia de radiación. Esto se logra alineando las coordenadas reales de la imagen del fármaco en el cuerpo, tal como se revela mediante tomografía computarizada o MRI, con el plan de tratamiento de irradiación antes y durante la terapia. Este tipo de fototerapia asistida por imágenes tiene una gran ventaja en el manejo efectivo del cáncer. Por consiguiente, la posibilidad de proporcionar el nanofotomedicamento de la invención con un marcador óptico y o agente de contraste magnético y utilizar por lo tanto el nanofotomedicamento dopado junto con agentes terapéuticos es un aspecto importante de esta invención.

En aún otra realización de aspectos de la presente invención, la construcción del nanofotomedicamento cuenta con la propiedad de dirigirse específicamente a los sitios de enfermedades tales como cáncer. Esto se puede lograr proporcionándole a la superficie del nanofotomedicamento fracciones de direccionamiento tales como ligandos del receptor. Esto ayuda a lograr la terapia fotodinámica destinada para el cáncer. La cantidad de ligando de direccionamiento es adecuadamente aproximadamente de 0,00001-1% en peso, con base en el peso total de la nanopartícula.

Para probar este concepto, los presentes inventores han preparado un nanofotomedicamento que comprende un fotosensibilizador, una nanopartícula y un ligando de direccionamiento. Como fármacos fotosensibilizadores, se seleccionaron meta-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC/Foscan) y clorina e_6 (Ce_6), como nanopartícula se eligió una sílice en nanopartículas y como ligando de direccionamiento se eligió un octreótido. El octreótido es un análogo sintético de la somatostatina. Muchos tumores neuroendocrinos y células inmunitarias (activadas) expresan una alta densidad de receptores de somatostatina (sst). El experto en la técnica entenderá que pueden hacerse variaciones en la selección del fotosensibilizador, la nanopartícula y el ligando de direccionamiento. Los inventores han utilizado el nanofotomedicamento dirigible preparado de este modo en configuraciones experimentales en diversos medios acuosos e *in vitro* en células positivas para sst (células K562, línea celular mieloide humana) así como en células de tipo silvestre para confirmar la validez del enfoque. La espectroscopia de absorción y excitación *in vitro* del conjugado combinado con datos de rendimiento cuántico de oxígeno singlete y ensayos de proliferación celular como se divulga en los Ejemplos siguientes confirman que estos nanofotomedicamentos exhiben la eficacia terapéutica deseada. Es importante observar que los presentes inventores prevén que pueden utilizarse enfoques similares para dirigirse a otros receptores y que la elección del fotosensibilizador y la nanopartícula no es crítica.

La presente invención proporciona un nuevo nanofotomedicamento que puede dirigirse potencialmente a células cancerosas *in vivo*, mejorar el contraste tumoral mediante la formación de imágenes de resonancia magnética y fluorescente bimodal y destruir células cancerosas mediante el suministro controlado de especies reactivas de oxígeno bajo exposición a la luz visible.

Un rasgo de caracterización de la presente invención es la conjugación del fotosensibilizador con nanopartículas de una manera cuasiagregada deseada y el descubrimiento de que esto cambia las propiedades fisicoquímicas del fotosensibilizador para hacerlo adecuado para una PDT eficaz y dirigida. El descubrimiento de que esta conjugación produce un estado cuasiagregado de fotosensibilizador que puede absorber mejor la luz a longitudes de onda que penetran en el tejido en comparación con el fármaco libre no conjugado y permitir la liberación controlada de especies reactivas de oxígeno tras la irradiación no se anticipó. Es una ventaja particular que la presente composición terapéutica se puede combinar con un ligando de direccionamiento y una funcionalidad de contraste magnética ya que esto soporta aplicaciones de PDT asistida por imágenes.

Métodos para producir el nanofotomedicamento de la invención

El nanofotomedicamento de la invención se puede preparar de muchas maneras diferentes. Dependiendo del tipo de nanopartícula y de la química del fotosensibilizador y de la matriz de nanopartículas (el material para la preparación de las nanopartículas).

Es esencial que se proporcione el fotosensibilizador asociado con la nanopartícula en un estado cuasiagregado. Como se mostrará en la presente memoria, se pueden obtener nanopartículas adecuadas mediante precipitación de un material precursor en nanocristales a partir de una solución a baja temperatura (por ejemplo, 20 - 80°C) o mediante un proceso (térmico) de alta temperatura. Preferiblemente, la nanopartícula se obtiene por precipitación a partir de una solución o de un coloide. Materiales precursores adecuados que en condiciones adecuadas precipitarán para formar una nanopartícula incluyen, pero no se limitan a, sulfuros metálicos, fosfatos metálicos y óxidos metálicos y combinaciones de los mismos, tales como silicatos y fosfatos de calcio. Un método altamente preferido es el conocido en la técnica para preparar partículas de sílice coloidal. Las partículas pueden ser cristales amorfos o cristalizarse completamente. Las partículas de sulfuro metálico, fosfato metálico y/o óxido metálico se pueden utilizar solos o pueden cubrirse o combinarse con un material polimérico para proporcionar una cerámica. Las nanopartículas de la presente invención están dopadas con fotosensibilizadores, materiales luminiscentes y materiales magnéticos preferiblemente por inclusión durante la formación de la partícula.

Preferiblemente, el fotosensibilizador está unido covalentemente a la nanopartícula. Por lo tanto, en el caso de la sílice, se produce adecuadamente (y preferiblemente) un fotosensibilizador reactivo con silicato. En forma muy adecuada, se utiliza un agente de acoplamiento de silano como agente de entrecruzamiento entre el fotosensibilizador y el silicato. En forma muy adecuada, se utiliza aminopropil trietoxisilano (APTS), ya que dicho compuesto puede hacerse reaccionar con un silicato para proporcionarle al silicato una funcionalidad de amina.

Una etapa en el método de la producción de un nanofotomedicamento de la invención, en una realización en la que la nanopartícula es silicato, es la provisión de un fotosensibilizador de amina reactiva. Para ello, se activa adecuadamente un fotosensibilizador que contiene carboxilo (Ce_6 tiene tres grupos carboxilo por molécula) haciendo reaccionar el fotosensibilizador con un exceso molar de una carbodiimida tal como EDC (EDAC), preferiblemente en presencia de una succinimida tal como Sulfo-NHS, usualmente en el disolvente DMSO. En esta reacción, los grupos carboxilo del fotosensibilizador se activan para formar compuestos intermedios reactivos con aminas, tales como ésteres Sulfo-NHS reactivos con aminas. La reacción de activación se deja adecuadamente continuar durante aproximadamente 1-10 horas, usualmente aproximadamente 4 horas para proporcionar el fotosensibilizador de amina reactiva. El producto se purifica opcionalmente por filtración en gel.

Una segunda etapa en la producción en tal realización es adecuadamente la reacción del fotosensibilizador de amina reactiva con aminopropil trietoxisilano (APTS) para proporcionar un fotosensibilizador reactivo con silicato (un fotosensibilizador con adición de grupos funcionales). Esta reacción de acoplamiento se continúa adecuadamente durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente. Un ejemplo de un compuesto resultante de esta etapa es Ce_6 -APTS.

En la etapa siguiente, el fotosensibilizador reactivo con silicato, por ejemplo, Ce_6 -APTS, se hace reaccionar con un precursor de ortosilicato para la síntesis de polvos de sílice nanoestructurados mediante procedimientos sol-gel tales como ortosilicato de tetraetilo (tetraetoxisilano, TEOS) y ortosilicato de tetrametilo (tetrametoxisilano, TMOS) para proporcionar un ortosilicato conjugado con fotosensibilizador (por ejemplo, Ce_6 -TEOS o Ce_6 -TMOS). Esta reacción de conjugación se realiza adecuadamente durante un período de 2-3 horas en etanol al 99%. El ortosilicato conjugado con fotosensibilizador forma el precursor para un dispositivo de nanopartículas en el que el fotosensibilizador cuasi agregado acoplado a silano está embebido para formar el nanofotomedicamento de la invención. Las nanopartículas de la invención se consiguen utilizando estos precursores de ortosilicato conjugados con fotosensibilizador en una reacción sol-gel.

Las etapas iniciales en la reacción de sol-gel implican la hidrólisis obligatoria del precursor de ortosilicato y la condensación de los productos hidrolizados para formar partículas pequeñas (3-4 silicio), las cuales se agregan para formar las partículas de sílice coloidal más grandes que pueden eventualmente condensarse para formar un gel de sílice. Sin embargo, esta última etapa preferiblemente no forma parte del proceso de la presente invención. Las partículas tienen un tamaño final de aproximadamente 90-100 nm y en ausencia de condiciones ácidas por lo general no se condensan para formar geles. La hidrólisis y la condensación de los precursores de ortosilicato conjugados con fotosensibilizador (por ejemplo, los precursores TEOS y/o TMOS conjugados con Ce_6) producen polvos de sílice de tamaño nanométrico en los que el fotosensibilizador está unido covalentemente en la matriz de sílice.

La hidrólisis de los precursores TEOS y/o TMOS conjugados con Ce_6 se puede lograr en solución acuosa mediante la adición al medio de etanol de una pequeña cantidad de agua y una base fuerte tal como NH_4OH u otra fuente de amonio o NaOH. A continuación, esta solución acuosa se somete a ultrasonido, por ejemplo, durante un lapso de 10 minutos utilizando un intervalo de 2 minutos, donde la sonicación trae como resultado la precipitación de nanopartículas del fotosensibilizador cuasiagregado complejo dentro de la matriz de sílice. Las partículas de nanofotomedicamento así precipitadas se pueden separar luego del medio acuoso (usualmente una mezcla etanol/agua/amoniaco) por centrifugación, y pueden lavarse opcionalmente en agua y dispersarse nuevamente en PBS o agua.

Aunque en el ejemplo anterior un precursor de silicato modificado con APTS podría reaccionar en principio con un fotosensibilizador de amina reactiva, se prefiere que el fotosensibilizador acoplado a APTS reaccione con el precursor de silicato, ya que esto da como resultado que se incorporen los fotosensibilizadores en la nanopartícula en crecimiento en el estado cuasiagregado más favorable.

De este modo, preferiblemente, se proporciona un fotosensibilizador con grupos funcionales para la unión covalente a precursores de nanopartículas de modo que proporcione un fotosensibilizador con adición de grupos funcionales. El experto en la materia conoce bien las diversas posibilidades de unir moléculas como los fotosensibilizadores a los precursores de nanopartículas. Estas técnicas implican generalmente la introducción de funciones amino, silano, tiol, hidroxilo y/o epoxi a los fotosensibilizadores, y la subsiguiente fijación de los mismos al precursor de nanopartículas, usando opcionalmente entrecruzadores. Cuando se hace referencia a tal realización de una aminoalquilsilanización de fotosensibilizadores en términos más generales, también se puede describir un método de preparación de un fotosensibilizador con adición de funciones para unión covalente a un precursor de nanopartículas según una realización de la presente invención, para emplear monómeros bifuncionales que actúan como agentes de enlazamiento y enlace del fotosensibilizador con el precursor de nanopartículas.

Muy adecuadamente, el monómero bifuncional puede tener dos funciones químicas diferentes, de modo que una función es capaz de reaccionar con el precursor de nanopartículas y la otra es capaz de reaccionar con un grupo funcional del fotosensibilizador.

5 El fotosensibilizador con adición de grupos funcionales y los precursores de nanopartículas se mezclan en solución o suspensión bajo condiciones que i) permiten la unión covalente del fotosensibilizador al precursor de nanopartículas para formar un precursor de nanopartículas conjugado con fotosensibilizador y que ii) permiten la formación de complejos precursores de nanopartículas mediante unión intermolecular de dichos precursores de nanopartículas y agregación de dichos complejos de precursores de nanopartículas para formar la nanopartícula mediante etapas subsiguientes como condensación y agregación. Preferiblemente, se permite que la etapa i) se produzca antes de la etapa ii). Esto da como resultado la situación en la que se proporciona el fotosensibilizador asociado con la nanopartícula en un estado cuasiagregado.

Las nanopartículas con las cuales se conjuga el fotosensibilizador pueden, durante o después de su preparación, ser dopadas adicionalmente con marcadores luminiscentes y/o marcadores de contraste magnéticos. Esto se realiza preferiblemente como se describe a continuación.

15 Nanofotomedicamento dopado con puntos cuánticos luminiscentes

El método de dopaje de las nanopartículas con materiales luminiscentes puede realizarse generalmente de la siguiente manera. En primer lugar, el precursor de nanopartículas conjugado con fotosensibilizador se prepara como se ha descrito anteriormente. El marcador luminiscente se dopa dentro de la nanomatriz durante la hidrólisis y condensación de este precursor mediante la adición del marcador a la solución de hidrólisis y condensación. A continuación, se aplican las condiciones para la formación de complejos precursores de nanopartículas mediante la condensación intermolecular de dichos precursores de nanopartículas y la agregación de dichos complejos precursores de nanopartículas para formar la nanopartícula. En el caso de los precursores de ortosilicatos, éstos incluyen la provisión de, por ejemplo, 1-5% de NH_4O_4 . Una cantidad adecuada del marcador luminiscente es, por ejemplo, ZnS: Mn^{2+} 0,01 μM en la solución de precipitado. La sonicación durante 10 minutos conduce a la precipitación de nanopartículas de dióxido de silicón complejadas con QD de Ce_6 y ZnS: Mn^{2+} cuasiagregados, que permanecen embebidos dentro de la matriz de nanopartículas. Los nanofotomedicamentos dopados precipitados se separan del medio por centrifugación y preferiblemente se lavan y almacenan en PBS. Para la administración de los nanofotomedicamentos de la invención, los dispositivos se suspenden preferiblemente en PBS.

Nanofotomedicamento dopado con agente de contraste magnético

30 El método de dopado de las nanopartículas con agente de contraste magnético es esencialmente el mismo que el descrito anteriormente para el marcador luminiscente. En primer lugar, el precursor de nanopartículas conjugado con fotosensibilizador se prepara como se ha descrito anteriormente. El precursor del agente de contraste magnético, por ejemplo: se añaden 0,001- 10% de Gd^{3+} (GdNO_3) o 0,001- 10% (Mn^{2+}) de MnCl_2 , o 0,001- 10% de Fe^{3+} (FeCl_3) a la solución de hidrólisis y condensación que forma las nanopartículas. El uso de nitrato de gadolinio, por ejemplo, resulta, en condiciones apropiadas, en la precipitación de nanopartículas complejadas con fotosensibilizador cuasiagregado y dopadas con Gd^{3+} , que permanece embebido dentro de la fase amorfa de la matriz de nanopartículas. Las nanopartículas precipitadas se separan del medio por centrifugación y se lavan preferiblemente antes de su uso.

Aplicaciones de la invención.

40 La terapia dirigida es un objetivo central de la medicina y minimizar el daño al tejido normal que rodea un volumen de tratamiento objetivo es de importancia crítica. El PDT se puede aplicar en prácticamente cualquier lugar del cuerpo. Mientras que la PDT induce una respuesta inmune sistémica tras la iluminación, el radio de acción de las especies de oxígeno reactivo es mucho más pequeño que el radio de una sola célula. En la práctica, los conjugados fotosensibilizadores no presentan toxicidad oscura, por lo tanto, la selectividad local (dentro del campo luminoso) ofrece oportunidades significativas. Ninguna célula o tejido es resistente o ha mostrado desarrollar resistencia a altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno. La presente invención puede superar muchas de las desventajas significativas de la terapia fotodinámica dirigida de la técnica anterior. Cuando los conjugados fotosensibilizadores tienen una biodisponibilidad limitada, una captación no específica y una capacidad limitada para generar especies reactivas de oxígeno por ligando de direccionamiento. Como se describe en la presente memoria, se usaron células que expresan sst2 para probar el principio de la aproximación de la presente invención. La presente invención puede utilizarse para dirigirse a otros receptores y puede aplicarse con otros fotosensibilizadores. Los objetivos moleculares para el cáncer están muy extendidos y son específicos para el tipo de tumor. Existe una clara razón para investigar la PDT dirigida a receptores de mama, próstata, pulmón, tumores cerebrales y para cáncer en el tracto GI. Otras enfermedades no malignas también pueden ser dirigidas. Por ejemplo, puesto que las células inmunes activadas en las articulaciones afectadas de pacientes con artritis reumatoide expresan una alta densidad de receptores de somatostatina (SS) (sst). La PDT dirigida sería un candidato ideal para tratar esta condición.

La presente invención se explicará ahora con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen el método de elaboración de nanofotomedicamentos (NPM) con dos fotosensibilizadores representativos separados, a saber, clorina e_6 (Ce_6) o m-THPC que están covalentemente embebidos dentro del dispositivo portador de tamaño nanométrico (50-150 nm) de sílice o quitosano en una etapa cuasiagregada adecuada con propiedad de fotoabsorción deseada del constructo final en la región de la banda Q (NIR rojo) donde la penetración de la luz en el tejido es mejor. El dopaje de estos nanofotomedicamentos con el segundo componente de puntos cuánticos luminiscentes adecuados para la formación de imágenes ópticas y el tercer componente de iones paramagnéticos adecuados para la formación de imágenes de contraste por MRI para formar un nanofotomedicamento dopada y/o conjugación con el ligando peptídico dirigido al cáncer activo para formar conjugados de nanofotomedicamentos (dopados), nuevas características de fotoblanqueamiento, suministro a células cancerosas y terapia fotodinámica utilizando dichos nanofotomedicamentos se describen en ejemplos separados.

Los reactivos usados para la preparación de nanofotomedicamentos incluyen ortosilicato de tetraetilo (TEOS, Sigma, 98%) u ortosilicato de tetrametilo (TMOS), aminopropil trietoxisilano (APTS, Sigma, 98%), amoníaco (solución al 25%, Sigma Aldrich) clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC o EDC), N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS), carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC, Sigma, 98%), etanol (99%, Sigma), Regulador de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) (Sigma), solución salina regulada con fosfato (PBS), clorina e_6 , m-tetrahidroxifenilclorina (m-THPC), puntos cuánticos (QD) de ZnS:Mn, nitrato de Gadolinio (Gd^{3+}) (99%, Sigma) y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), todos los reactivos de grado analítico y se usaron sin purificación adicional.

En el método de síntesis, a diferencia de la técnica anterior (patente estadounidense No. 7.364.754) se utilizó medio no micelar libre de tensoactivos que contenía un sistema disolvente simple, de bajo costo y homogéneamente miscible de etanol o DMSO con agua.

Ejemplo 1: Producción del nanofotomedicamento NPM-1 usando Ce_6 como fotosensibilizador

En este ejemplo, se presenta la preparación del nanofotomedicamento con base en el fotosensibilizador clorina e_6 (Ce_6) (es decir NPM-1) que tiene una absorción de luz aproximadamente 2 veces mayor debido al constructo final en la región de la banda Q (654 nm) comparado con aquel de Ce_6 libre.

Se hizo reaccionar una concentración 1 μ M de Ce_6 (comercialmente disponible a través de, por ejemplo, Porphyrin Products, Logan, UT) con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 de Sulfo-NHS en 5 mL de DMSO al 99%. Después de 4 horas de reacción, el producto conjugado se purifica por filtración en gel proporcionando un fotosensibilizador de amina reactiva, que se hace reaccionar adicionalmente con el agente de acoplamiento de silano usando 200 μ L de APTS. La reacción de acoplamiento se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce_6 -APTS. En la etapa siguiente, el Ce_6 -APTS se hace reaccionar con 600 μ L (aproximadamente 600 mg) de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor para el fotosensibilizador cuasiagregado acoplado con silano. La hidrólisis de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua y 600 μ L de NH_4O_4 bajo sonicación durante 10 minutos con un intervalo de 2 minutos conduce a la precipitación de nanopartículas de Ce_6 cuasiagregado complejo dentro de la matriz de sílice. El NPM-1 precipitado se separa del medio disolvente por centrifugación (6000 rpm, 5 minutos) y se lava con agua destilada antes de volver a dispersarse en PBS.

La micrografía electrónica de transmisión (Figura 1) muestra la formación de nanopartículas esféricas uniformes de tamaño 90-100 nm. El espectro de excitación fluorescente del NPM-1 (Figura 2a) muestra que la absorción de luz a 654 nm correspondiente a la transición electrónica de triple estado responsable de la generación de oxígeno singlete y/o fluorescencia del constructo es \sim 2 veces mayor que aquel de fotosensibilizador libre. Esto indica que el fotosensibilizador dentro del constructo del nanofotomedicamento ya no está en forma libre, sino que es una entidad complejada conectada covalentemente mediante un enlace amida mediado por grupos de aminopropil silano.

Ejemplo 2: Características del nanofotomedicamento NPM-2 con Ce_6 como fotosensibilizador

En este ejemplo, se ilustra el procesamiento del nanofotomedicamento (NPM-2) con una absorción de luz 4 veces mayor en la banda Q comparada aquella de Ce_6 libre.

Se hizo reaccionar una concentración 1 μ M de Ce_6 con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 de Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de \sim 4 horas de reacción, el conjugado se purifica por filtración en gel proporcionando un fotosensibilizador de amina reactiva que se hace reaccionar con el agente de acoplamiento de silano usando 300 μ L de APTS. La reacción de acoplamiento se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce_6 -APTS. En la etapa siguiente, se hace reaccionar Ce_6 -APTS con 800 μ L de TEOS o TMOS durante 3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor para NPM-2. La hidrólisis de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua y 600 μ L de NH_4O_4 bajo sonicación durante 15 minutos con un intervalo de 2 min conduce a la precipitación de nanofotomedicamentos NPM-2 en los que Ce_6 está cuasiagregado en un nivel aún más alto y permanece covalentemente embebido dentro de la matriz de nanopartículas a través de un enlace amida. Las partículas de NPM-2 precipitadas se separan del medio etanólico por centrifugación y se lavan con agua destilada antes de volver a dispersarse en PBS. Los espectros de excitación fluorescente de NPM-2 mostrados en la Figura 2 indican un aumento de \sim 4 veces en la

absorción de la banda Q a 654 nm en comparación con aquella del fármaco libre. La absorción en la región de la banda de Soret permanece en gran parte sin cambios. Esta absorción mejorada de la banda Q puede conducir a la producción de oxígeno singlete a una mayor profundidad del tejido en comparación con el caso del fotosensibilizador libre.

5 Ejemplo 3: Producción del nanofotomedicamento NPM-3 usando Ce₆ como fotosensibilizador

En aún otro ejemplo, se ilustra la producción del nanofotomedicamento (NPM-3) con una absorción ~7 veces mayor en la región de banda Q comparada con aquella de Ce₆ libre.

10 Se hizo reaccionar una concentración 1 μ M de Ce₆ con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 de Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de 4 horas de reacción, el producto conjugado se purificó por filtración en gel proporcionando Ce₆ de amina reactiva que se hace reaccionar con el agente de acoplamiento de silano usando 600 μ L de APTS. La reacción de acoplamiento se continuó durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce₆-APTS. En la siguiente etapa, se hizo reaccionar Ce₆-APTS con 1000 μ L de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor para el fotomedicamento cuasiagregado acoplado con silano. La hidrólisis de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua y 800 μ L de NH₄O₄ bajo sonicación durante 20 minutos con un intervalo de 2 minutos conduce a la precipitación de nanopartículas de NPM-3 complejadas con otro Ce₆ cuasiagregado que permanece embebido dentro de la matriz de nanopartículas. Las partículas de NPM-3 precipitadas se separan del medio etanólico por centrifugación y se lavan con agua destilada antes de ser nuevamente dispersadas en solución de PBS para administración.

20 El espectro de excitación fluorescente de NPM-3 (Figura 2) indica una mayor absorción de luz en la región de 654 nm, casi 7 veces más alta que aquella del fármaco libre y aproximadamente 75% equivalente al de la absorción de la banda Soret del mismo constructo.

25 El aumento controlado en la absorción de la banda Q del nanofotomedicamento por la extensión de la modificación química y lo más importante estabilización de la misma dentro del dispositivo nanoportador que protege la molécula fotosensibilizadora de cualquier agregación adicional incontrolable en agua o PBS o debido a la influencia de las proteínas en la sangre o después de la acumulación en el sitio de la enfermedad, es un logro importante de la presente invención. De este modo, la presente invención supera uno de los mayores retos de la agregación incontrolada de fotosensibilizador y pérdida de propiedades fotosensibles observadas con fotosensibilizadores libres.

Ejemplo 4: Producción del nanofotomedicamento NPM-4 utilizando m-THPC como fotosensibilizador

30 En este ejemplo, se ilustra la producción del nanofotomedicamento (NPM-4) con otro fotosensibilizador importante m-THPC. El producto muestra un cambio del 100% de las propiedades de absorbencia de luz de la banda Soret a la banda Q a 652 nm mientras que se mantiene su alta fluorescencia y actividad del fotosensibilizador.

35 Se trató una concentración 1 μ M de m-THPC de amina reactiva con 600 μ L de agente de acoplamiento de silano APTS durante 24 horas en la oscuridad. Después de 24 h, el conjugado m-THPC-APTS se hizo reaccionar con 1000 μ L de TEOS o TMOS durante 6 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor del nanofotomedicamento cuasiagregado acoplado con silano, m-THPC. La hidrólisis de este precursor mediante la adición de 6 mL de agua y 800 μ L de NaOH bajo sonicación durante 20 minutos con un intervalo de 2 minutos conduce a la precipitación de nanopartículas de NPM-4 complejadas con m-THPC cuasiagregado.

40 Este producto muestra características completamente diferentes de absorción/excitación, en comparación con m-THPC libre, como se muestra en la Figura 3. La absorción en la banda Soret a aproximadamente 400 nm se encontró completamente inactivada mientras que la absorción esencial necesaria para la fototerapia, en la banda Q se incrementó en un 70-80%. La absorción de la banda Q que es tan alta como aquella de la banda Soret de sensibilizador libre puede resultar en una mejora significativa de la eficacia terapéutica durante la terapia fotodinámica. Este constructo supera una de las principales desventajas del fotosensibilizador libre, que es la absorción de baja luz en la región roja del espectro

Ejemplo 5: Propiedades fotofísicas *ex vivo* del nanofotomedicamento NPM-3

En este ejemplo, se ilustran las propiedades fotofísicas de la nanofotomedicamento preparada en el Ejemplo 3 (NPM-3). Se demuestran mejoras significativas del producto en comparación con el fármaco libre en la terapia fotodinámica.

50 La fotoestabilidad del fármaco es muy importante para la terapia prolongada de una enfermedad como el cáncer. Sin embargo, los fotofármacos, particularmente fármacos solubles en agua como Ce₆, sufren una fotodegradación muy rápida, ya que están sujetos a degradación por el oxígeno singlete producido por el propio fármaco. Esto conduce a la terminación prematura del tratamiento debido a una concentración insuficiente del fármaco en el sitio de la enfermedad. En este ejemplo se muestra cómo el nanofotomedicamento supera este problema.

Las características de fotoblanqueamiento de Ce₆ libre y el nanofotomedicamento (NPM-3) que tienen casi la misma intensidad de fluorescencia inicial (que se correlaciona con la concentración del fármaco) se comparan usando un espectrómetro de fluorescencia. La irradiación con láser de muestras de ambos productos se realizó en condiciones idénticas con una dosis total de 10 J cm⁻². La Figura 4 ilustra los cambios en las características de emisión de fluorescencia de ambas muestras. El Ce₆ libre muestra un blanqueo rápido típico que da lugar a una inactivación del fármaco con intensidades tan bajas como 2,5 J cm⁻², mientras que el constructo NPM-3 muestra una característica no lineal única y fotoestabilidad del fármaco embebido incluso después de recibir una fotodosis de 10 J cm⁻². La curva de fotoblanqueamiento para NPM-3 muestra múltiples fases que implican tanto la mejora como la reducción de la emisión de fluorescencia del fármaco. Esto revela una naturaleza espacialmente heterogénea (cuasiagregada) del fármaco embebido tras la interacción con la luz e indica que el fármaco está sujeto a una monomerización *in situ* seguido por blanqueamiento de una manera repetida. En efecto, esto conduce a una estabilidad del fármaco a largo plazo dentro del constructo incluso después de una duración prolongada de la terapia.

Ejemplo 6: Propiedades fotofísicas *in vivo* del nanofotomedicamento NPM-3

En este ejemplo, se probó la fotoestabilidad del nanofotomedicamento intracelularmente dentro de las células cancerosas y se comparó con aquella del fotosensibilizador libre.

Se sembraron células de leucemia K562 a razón de 800.000 células/pozo en una placa de cultivo de tejidos de 12 pozos y se trataron tanto con Ce₆ libre (1 μM) como con nanofotomedicamento (NPM-3) preparadas usando la misma concentración del sensibilizador. Las células se incubaron a 37°C durante 3 horas antes de la formación de imágenes utilizando microscopio confocal. La formación de imágenes de fluorescencia se llevó a cabo mediante la excitación del sensibilizador o el nanofotomedicamento absorbido por las células utilizando láser a 405 nm. Para registrar el fotoblanqueamiento en las regiones intracelulares de las células cancerosas, que tiene una correlación significativa con los efectos terapéuticos, la formación de imágenes se lleva a cabo después de la duración estipulada de la irradiación láser (de 1-360 segundos).

La Figura 5a muestra imágenes confocales de células tratadas con Ce₆ libre en el que el fármaco se encontró completamente blanqueado en la región de irradiación con láser después de 30 segundos, mientras que en la Figura 5b, las células tratadas con el nanofotomedicamento, mostraron fluorescencia estable incluso hasta 360 segundos. Esto confirma que las características espectroscópicas observadas como se describe en el Ejemplo 5 también son verdaderas en células biológicas, es decir, *in vivo*. Esta característica única del nanofotomedicamento es crítica en proporcionar una duración prolongada de la fototerapia del cáncer ya que el mantenimiento de la actividad de fluorescencia del fármaco es esencial para la fototerapia.

Ejemplo 7: Producción de nanofotomedicamento dopado con puntos cuánticos luminiscentes

En este ejemplo, se ilustra la producción del nanofotomedicamento NPM-5, dopado con puntos cuánticos luminiscentes de ZnS: Mn²⁺ para formar un nanofotomedicamento dopado.

Los QD luminiscentes son candidatos prometedores para la formación de imágenes *in vivo* de una enfermedad incluyendo cáncer. Sin embargo, los QD luminiscentes utilizados usualmente contienen el metal pesado cadmio, tóxico, en la composición (CdS, CdSe, CdTe, etc.). Esto limita el uso de tales QD, así como nanodispositivos dopados con tales QD para aplicaciones clínicas humanas. Por el contrario, la presente invención utiliza puntos cuánticos completamente no tóxicos con base en ZnS dopado con metales (Cu o Al) o metales de transición (Mn) para su incorporación en el nanofotomedicamento, que puede usarse para la formación de imágenes ópticas de los NPM sin afectar la fluorescencia y las propiedades de generación de oxígeno singlete del fotosensibilizador embebido.

Por consiguiente, en una preparación típica, Ce₆ 1 μM reaccionó con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 veces Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de 2-4 horas de reacción, el producto conjugado se purifica por filtración en gel, resultando un fotosensibilizador 'activado' de amina reactiva para reaccionar con 600 μL del agente de acoplamiento de silano APTS. La reacción se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce₆-APTS-1. Después de 3-4 horas, el Ce₆-APTS-1 se hace reaccionar con 1000 μL de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor para el fotosensibilizador cuasiagregado acoplado a silano. Los puntos cuánticos se dopan dentro de la nanomatriz durante la hidrólisis y la condensación de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua que contiene los QD de ZnS:Mn²⁺ 0,01 μM y 800 μL de NH₄O₄ bajo sonicación durante 10 minutos, conduce a la precipitación de nanopartículas de dióxido de silicio complejadas con Ce₆ cuasiagregado y los QD de ZnS:Mn²⁺, que permanecen embebidos dentro de la matriz de nanopartículas. El nanofotomedicamento dopado precipitado se separa del medio etanólico mediante centrifugación y se lava con agua destilada antes de dispersarse nuevamente en solución de PBS para administración.

La Figura 6a muestra el patrón de difracción de rayos X de los QD de ZnS embebidos dentro del nanofotomedicamento, la Figura 6b y la Figura 6c muestran los espectros de emisión de fluorescencia a 600 nm y una fotografía digital de la muestra dispersa en agua que emite color naranja a partir de ZnS: Mn embebido lo que confirma el dopaje exitoso de los QD dentro del nanofotomedicamento dopado.

La emisión de fluorescencia de los QD puede usarse para formar imágenes del cáncer *in vivo*, después de la localización del nanofotomedicamento dopado en el tejido destinado, usando dispositivos de excitación y emisión de fibra óptica. Esto ayuda a mejorar los métodos actuales de dosimetría fotodinámica que actualmente se basan en las propiedades de fluorescencia del fotosensibilizador libre. El uso de los QD para la detección de cáncer y la dosimetría ayuda a lograr estos objetivos sin fotoblanqueamiento (destrucción) del fotosensibilizador.

Ejemplo 8: Producción del nanofotomedicamento dopado con gadolinio (Gd^{3+})

En este ejemplo, se describe la producción de NPM-5 dopado con un agente de contraste magnético de gadolinio (Gd^{3+}) para formar una nanofotomedicamento dopada.

Se hizo reaccionar una concentración 1 μM de Ce_6 con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 de Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de 2-4 horas de reacción, el producto conjugado se purifica por filtración en gel, resultando un fotomedicamento 'activado' de amina reactiva para reaccionar con 600 μL del agente de acoplamiento de silano de APTS. La reacción se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce_6 -APTS-1. Después de 3-4 horas, se hace reaccionar Ce_6 -APTS-1 con 1000 μL de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor del nanofotomedicamento cuasiagregada acoplada con silano. Los agentes magnéticos se dopan dentro de la nanomatriz durante la hidrólisis y la condensación de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua que contiene nitrato de gadolinio 0,01 M seguido de 800 μL de NH_4O_4 bajo sonicación durante 10 minutos conduce a la precipitación de nanopartículas de dióxido de silicio complejado con Ce_6 cuasiagregado y dopado con Gd^{3+} , que permanecen embebido dentro de la fase amorfa de la matriz de nanopartículas. Las nanopartículas precipitadas se separan del medio etanólico por centrifugación y se lavan con agua destilada antes de volver a dispersarse en solución de PBS.

Los estudios magnéticos llevados a cabo utilizando un magnetómetro vibratorio de muestras revelaron la propiedad paramagnética (Figura 7) del nanofotomedicamento dopada con Gd^{3+} en comparación con la respuesta diamagnética de Ce_6 libre. Además, se demostró la aplicabilidad de este sistema para la formación de imágenes de resonancia magnética mediante la obtención de imágenes de una colección de aproximadamente 80.000 células cancerosas tratadas con el nanofotomedicamento dopado en una placa de 24 pozos usando una unidad clínica de MRI a 1.5T. La Figura 8 muestra la formación de imágenes de contraste ponderadas T1 de las células tratadas con el nanofotomedicamento dopado de diferente concentración junto con células de control (células no tratadas) y células tratadas con Ce_6 libre. Se puede observar que el contraste aumenta con la concentración de nanofotomedicamentos, confirmando que los nanofotomedicamentos dopados descritos en la presente invención se pueden usar para diagnóstico con base en MRI junto con terapia fotodinámica. Esto tiene importancia en la planificación preterapéutica, entendiendo la farmacocinética del fármaco administrado usando una técnica completamente no invasiva y un análisis de la eficacia después del tratamiento.

Ejemplo 9: Producción del nanofotomedicamento dopado con Manganeso (Mn^{2+})

En este ejemplo, se describe la producción de NPM-6 dopado con un agente de contraste magnético de manganeso (Mn^{2+}) para formar un nanofotomedicamento dopado.

Se hizo reaccionar una concentración 1 μM de Ce_6 con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 de Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de 2-4 horas de reacción, el producto conjugado se purifica por filtración en gel, resultando un fotomedicamento 'activado' de amina reactiva que reacciona con 600 μL del agente de acoplamiento de silano de APTS. La reacción se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce_6 -APTS-1. Después de 3-4 horas, se hace reaccionar Ce_6 -APTS-1 con 1000 μL de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%, formando el precursor para el nanofotomedicamento cuasiagregado acoplado con silano. Los agentes magnéticos se dopan dentro de la nanomatriz durante la hidrólisis y la condensación de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua que contiene sulfato de manganeso 0,01 M seguido de 800 μL de NH_4O_4 bajo sonicación durante 10 minutos conduce a la precipitación de las nanopartículas de dióxido de silicio complejadas con Ce_6 cuasiagregado y dopado con Mn^{2+} , que permanece embebido dentro de la fase amorfa de la matriz de nanopartículas. Las nanopartículas precipitadas se separan del medio etanólico por centrifugación y se lavan con agua destilada antes de volver a dispersarse en solución de PBS.

Ejemplo 10: Producción de nanofotomedicamento dopado con hierro (Fe^{3+})

En este ejemplo, se describe la producción de NPM-5 dopado con agente de contraste magnético de hierro (Fe^{3+}) para formar un nanofotomedicamento dopado.

Se hizo reaccionar una concentración 1 μM de Ce_6 con un exceso molar de 10-15 veces de EDAC y un exceso molar de 10-15 veces de Sulfo-NHS en 5 mL de etanol al 99%. Después de 2-4 horas de reacción, el producto conjugado se purifica por filtración en gel, resultando un fotomedicamento 'activado' de amina reactiva que reacciona con 600 μL del agente de acoplamiento de silano de APTS. La reacción se continúa durante 3-4 horas en la oscuridad, a temperatura ambiente, proporcionando el compuesto Ce_6 -APTS-1. Después de 3-4 horas, se hace reaccionar Ce_6 -APTS-1 con 1000 μL de TEOS o TMOS durante 2-3 horas en 10 mL de medio etanólico al 99%,

- 5 formando el precursor del nanofotomedicamento cuasiagregado acoplado con silano. Los agentes magnéticos se dopan dentro de la nanomatriz durante la hidrólisis y la condensación de este precursor mediante la adición de 3 mL de agua que contiene cloruro de hierro 0,01 M (FeCl_3) seguido de 800 μL de NH_4O_4 bajo sonicación durante 10 minutos que conduce a la precipitación de nanopartículas de dióxido de silicio complejoado con Ce_6 cuasiagregado y dopado con Fe^{3+} , que permanece embebido dentro de la fase amorfa de la matriz de nanopartículas. Las nanopartículas precipitadas se separan del medio etanólico por centrifugación y se lavan con agua destilada antes de volver a dispersarse en solución de PBS.
- 10 Los estudios magnéticos llevados a cabo utilizando un magnetómetro vibratorio de muestras revelaron la propiedad paramagnética (Figura 7) del nanofotomedicamento dopado con Gd^{3+} en comparación con la respuesta diamagnética de Ce_6 libre. Además, se demostró la aplicabilidad de este sistema para la formación de imágenes de resonancia magnética mediante la obtención de imágenes de una colección de aproximadamente 80.000 células cancerosas tratadas con el nanofotomedicamento dopado en una placa de 24 pozos usando una unidad clínica de MRI a 1.5T. La Figura 8 muestra la formación de imágenes de contraste ponderadas T1 de las células tratadas con el nanofotomedicamento dopado de diferente concentración junto con células de control (células no tratadas) y células tratadas con Ce_6 libre. Se puede observar que el contraste aumenta con la concentración de nanofotomedicamentos, confirmando que los nanofotomedicamentos dopados descritos en la presente invención se pueden usar para diagnóstico con base en MRI junto con terapia fotodinámica. Esto tiene importancia en la planeación preterapéutica, entendiendo la farmacocinética del fármaco administrado usando una técnica completamente no invasiva y un análisis de la eficacia después del tratamiento.
- 20 Ejemplo 11
- En este ejemplo, se describe el suministro del nanofotomedicamento conjugado con péptido a células cancerosas y terapia fotodinámica mediante la sensibilización del nanofotomedicamento conjugado usando un láser rojo (emisión 652 nm).
- 25 Se sembraron células de leucemia K562 a razón de 800.000 células/pozo en una placa de microtitulación de 96 pozos y se trataron con Ce_6 libre (1 μM), 0,05 mg/mL del nanofotomedicamento (NPM-3) que proporciona una concentración igual de sensibilizador que el fotosensibilizador libre, y 0,05 mg/mL de nanopartículas de sílice pura como control. Las células se incubaron a 37°C durante 3 horas bajo CO_2 al 5%. Posteriormente, el sensibilizador libre no unido, el nanofotomedicamento y las nanopartículas de sílice se retiraron de la placa de pozos y se lavaron 2 veces con medio fresco.
- 30 Se utilizó una muestra de ensayo para estudiar la captación celular del nanofotomedicamento conjugado con péptido. La Figura 9 muestra la captación subcelular significativa del nanofotomedicamento conjugado por células cancerosas, lo que confirma el éxito del suministro del fármaco.
- 35 Posteriormente, se llevó a cabo una PDT utilizando un láser de estado sólido que emite una luz coherente a 652 nm acoplado a través de un irradiador de fibra óptica, que suministra potencia láser uniforme sobre todos los pozos de la placa de 96 pozos. Se aplicó una dosis total de luz de 20 J cm^{-2} como se midió usando un medidor de potencia láser. Se suministró una cantidad de 5 mW de potencia láser durante un periodo de 4000 segundos para conseguir la dosis total de 20 J cm^{-2} .
- 40 Tras la PDT, las células se incubaron adicionalmente durante 72 días para evaluar la viabilidad celular y la capacidad proliferativa de las células tratadas usando un ensayo estándar (Roche Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) que utiliza absorción óptica (densidad óptica) de cristales de formazano (480 nm) formados en las mitocondrias de las células viables debido a la actividad metabólica de estas células. Por lo tanto, esta prueba proporciona información directa a cerca de la muerte/viabilidad celular debido al tratamiento de PDT.
- 45 La Figura 10 muestra el resultado del ensayo WST. Estos datos sugieren claramente que, en comparación con el fotosensibilizador libre, los tres constructos del nanofotomedicamento muestran un mayor efecto terapéutico (destrucción de las células cancerosas). Esto confirma la propiedad ventajosa de dichos constructos en terapia fotodinámica.

Reivindicaciones

1. Un método para la producción de una nanopartícula que contiene un fotosensibilizador adecuado para su uso en terapia fotodinámica dirigida asistida por formación de imágenes molecular que comprende:
 - a) proporcionar una molécula precursora de nanopartículas;
 - 5 b) acoplar un fotosensibilizador a dicha molécula precursora de nanopartículas para proporcionar un precursor de nanopartículas conjugado con fotosensibilizador,
 - c) formar una nanopartícula a partir de dicha mezcla precursora de fotosensibilizador-nanopartícula resultante de la etapa b) mediante precipitación en solución o autoensamblaje molecular.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende además una etapa que comprende añadir un agente de contraste magnético y/u óptico al conjugado precursor de fotosensibilizador-nanopartícula para proporcionar una mezcla precursora de fotosensibilizador-nanopartícula, en donde la etapa de adición de un agente de contraste magnético y/u óptico es después de la etapa de acoplamiento del fotosensibilizador (b) y antes de la etapa de formación de una nanopartícula (c).
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dichas nanopartículas están formadas a partir de un material seleccionado del grupo que consiste en sulfato metálico, fosfato metálico, óxido metálico, quitosano, carboximetilquitosano (CMC), alcohol polivinílico (PVA), poliestireno (PS), polivinilpirrolidona (PVP), ácido poliláctico (PLA), polietilenimina (PEI), poli(ácido láctico coglicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polietilenglicol (PEG) y combinaciones de los mismos.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho óxido metálico es sílice, en donde dicha molécula precursora es un ortosilicato y en donde dicha nanopartícula se forma mediante un proceso de hidrólisis y condensación de precursores de ortosilicato en condiciones de pH básico y bajo sonicación para formar nanopartículas de sílice coloidal.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho fotosensibilizador se selecciona de clorina e₆ (Ce₆), meso-tetra(3-hidroxifenil)clorina (m-THPC), anillo A del monoácido derivado de benzoporfirina (BPD o verteporfina), fotofrina, temoporfina (Foscan®), rosa de Bengala, ftalocianina metálica y combinaciones de los mismos.
6. Una nanopartícula que contiene fotosensibilizador, que puede ser obtenida mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 30 7. Una nanopartícula que contiene fotosensibilizador, que comprende un fotosensibilizador unido covalentemente a través de al menos parte de dicha nanopartícula al material de la matriz de nanopartículas e incorporada allí como una mezcla de moléculas monoméricas y agregadas, en donde la relación de la absorción de la banda Q con respecto a la absorción de la banda Soret de dichas nanopartículas tiene un valor de al menos 0,3.
- 35 8. Una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicha nanopartícula se forma a partir de un material seleccionado del grupo que consiste en sulfato metálico, fosfato metálico, óxido metálico, carboximetilquitosano (CMC), alcohol polivinílico (PVA), poliestireno (PS), Polivinilpirrolidona (PVP), ácido poliláctico (PLA), polietilenimina (PEI), poli(ácido láctico coglicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polietilenglicol (PEG) y combinaciones de los mismos.
9. Una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho óxido metálico es sílice.
- 40 10. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicho fotosensibilizador se selecciona de clorina e₆ (Ce₆), meso-tetra(3-hidroxifenil)clorina (m-THPC), anillo A del monoácido derivado de benzoporfirina (BPD o verteporfina), Fotofrina, temoporfina (Foscan®), rosa de Bengala, ftalocianina metálica y combinaciones de los mismos.
- 45 11. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicha nanopartícula se dopa con un agente de contraste óptico y/o una función de contraste magnético, preferiblemente en donde el agente de contraste óptico es de puntos cuánticos luminiscentes de ZnS dopados con Mn²⁺, Cu⁺-Al³⁺ o Cu⁺-halógeno o combinaciones de los mismos, o preferiblemente en donde la función de contraste magnético es proporcionada mediante dopaje del nanofotomedicamento con Gd³⁺, Fe³⁺ o Mn²⁺.
- 50 12. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en donde dicha nanopartícula comprende un ligando dirigido contra el cáncer conectado a la superficie más externa a través de un enlace covalente.
13. Una nanopartícula de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el ligando dirigido contra el cáncer es un octreótido u octreotato o sus derivados carboxilato tales como DTPA-Tyr3-octreótido, DOTA-Tyr3-octreótido, DTPA-Tyr3-octreotato o DOTA-Tyr3-octreotato que dirige al receptor de somatostatina tipo 2.

14. Una composición inyectable o composición para administración oral que comprende las nanopartículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 15. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13 para uso en un método para matar células cancerosas mediante tratamiento con PDT, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con dicha nanopartícula e irradiar dichas nanopartículas con una cantidad terapéuticamente eficaz de luz para provocar la emisión del oxígeno singlete a partir de dichas nanopartículas.

10 16. Una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13 para uso en un método para matar células cancerosas mediante tratamiento con PDT asistido por imágenes, que comprende poner en contacto dichas células cancerosas con dicha nanopartícula e irradiar dichas nanopartículas con una cantidad terapéuticamente eficaz de luz para provocar la emisión de oxígeno singlete a partir de dichas nanopartículas en donde la nanopartícula se dopa con un agente de contraste óptico y/o un agente de contraste magnético y en donde la dirección de dicha irradiación es guiada mediante técnicas de formación de imágenes que utilizan el agente de contraste óptico o magnético como marcador para indicar la ubicación, tamaño y propagación de las células cancerosas.

15

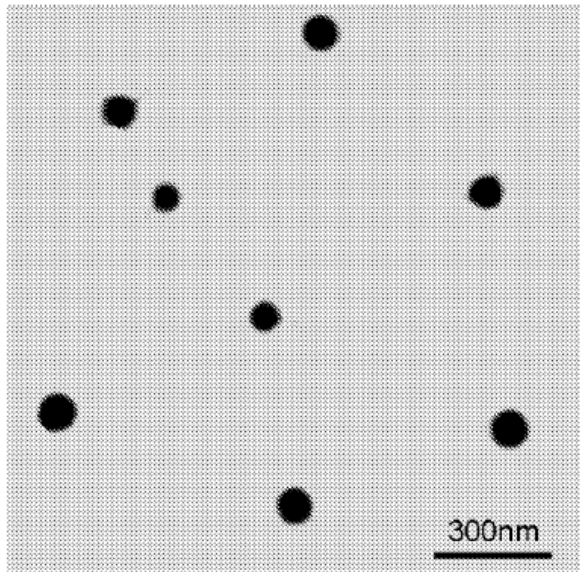


Fig. 1

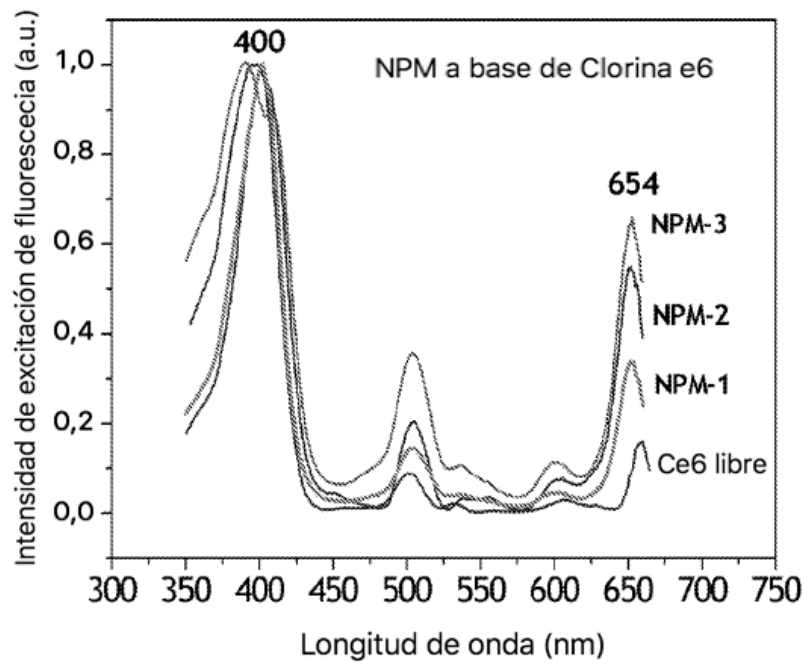


Fig. 2

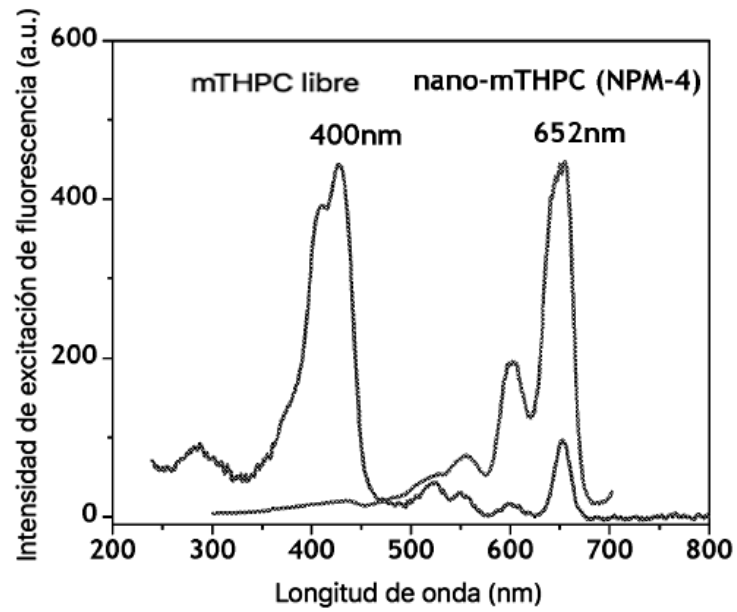


Fig. 3

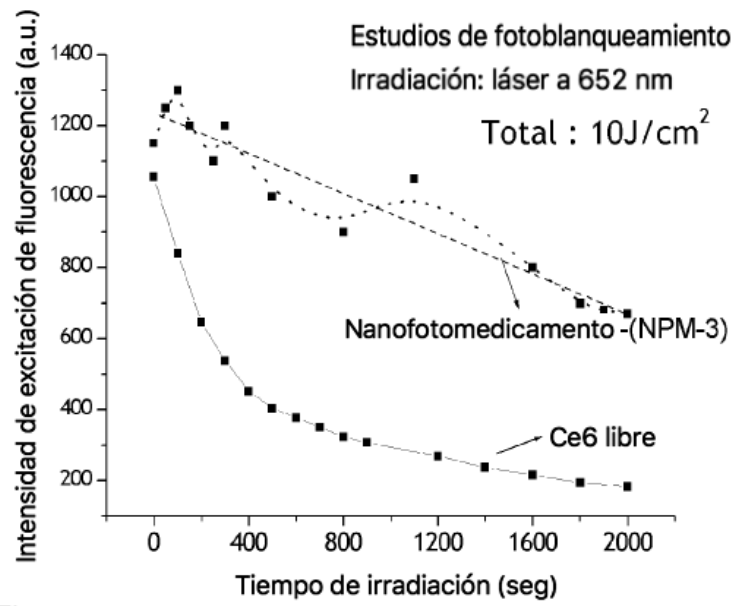


Fig. 4

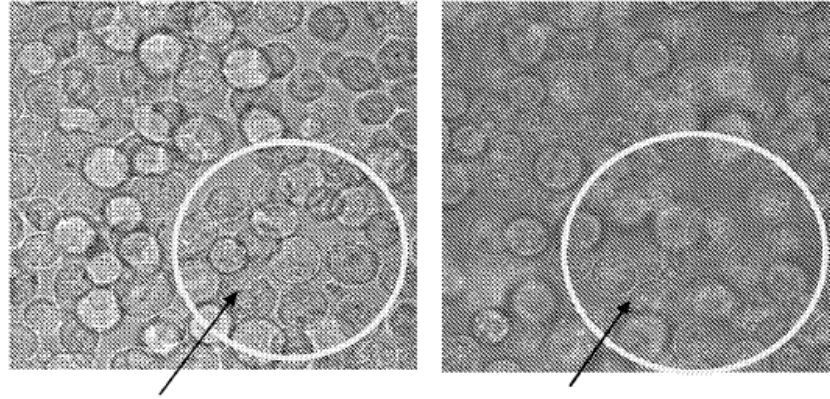


Fig. 5

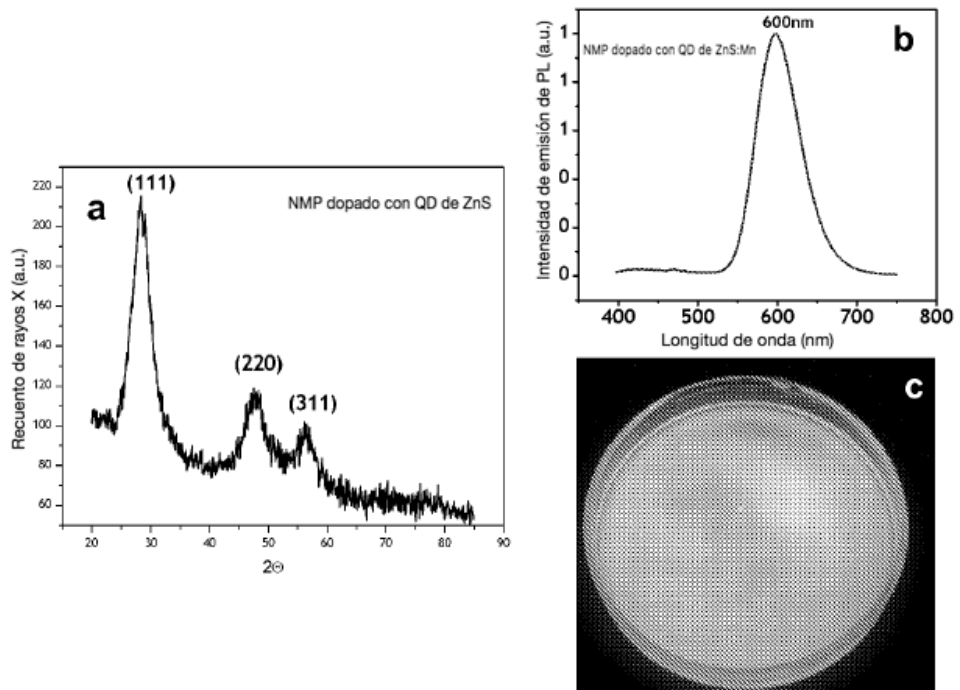


Fig. 6

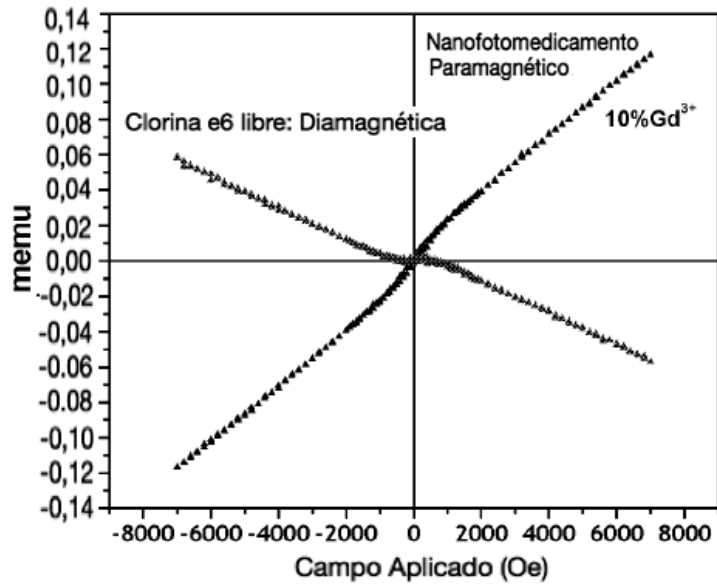


Fig. 7

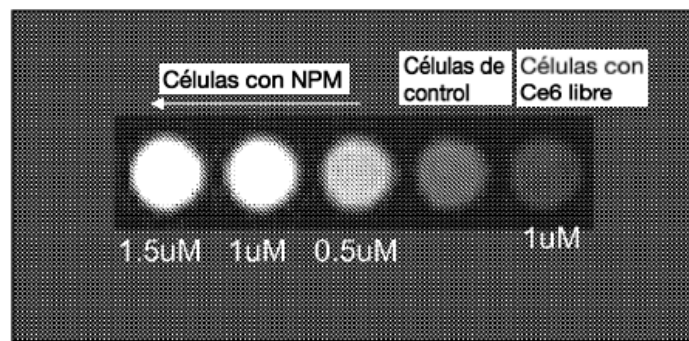


Fig. 8

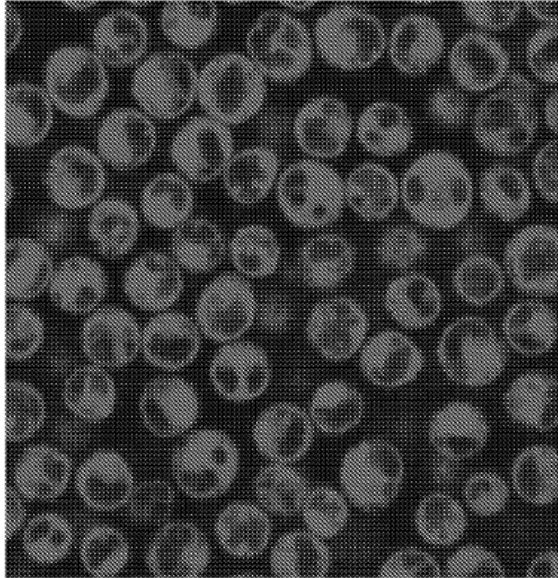


Fig. 9

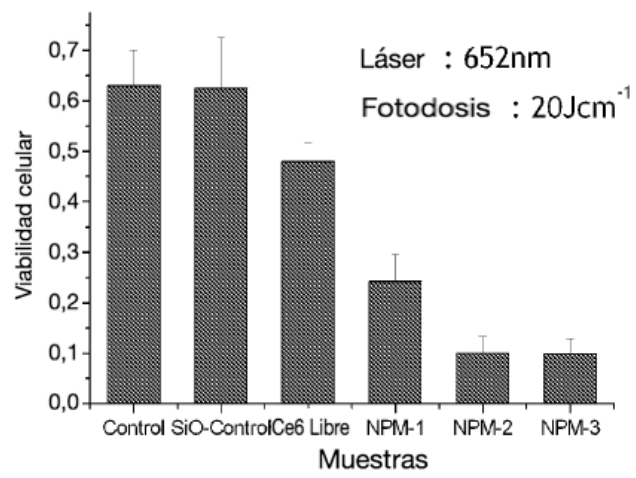


Fig. 10