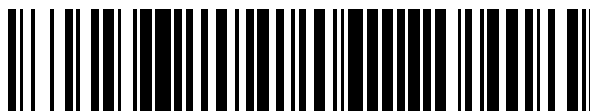


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 187**

51 Int. Cl.:

| | | |
|--------------------|------------------------------|-----------|
| A61K 9/10 | (2006.01) A61K 9/00 | (2006.01) |
| A61K 47/06 | (2006.01) A61K 47/34 | (2007.01) |
| A61K 33/24 | (2006.01) A61K 45/06 | (2006.01) |
| B82Y 5/00 | (2011.01) A61K 31/136 | (2006.01) |
| A61K 47/02 | (2006.01) A61K 31/337 | (2006.01) |
| A61P 35/00 | (2006.01) A61K 31/513 | (2006.01) |
| A61K 47/50 | (2007.01) A61K 33/00 | (2006.01) |
| A61K 47/32 | (2006.01) | |
| A61K 31/704 | (2006.01) | |
| A61K 33/26 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/AU2012/000414**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12142669**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774165 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2699233**

54 Título: **Material en forma de partículas y toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido**

30 Prioridad:

20.04.2011 AU 2011901495
20.04.2011 US 201161477382 P
09.02.2012 AU 2012900480

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF SYDNEY (100.0%)
Sydney, NSW 2006, AU

72 Inventor/es:

HAWKETT, BRIAN STANLEY;
HAMBLEY, TREVOR WILLIAM;
BRYCE, NICOLE SARAH;
PHAM, THI THUY BINH y
JAIN, NIRMESH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 629 187 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

Material en forma de partículas y toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la coadministración de un material en forma de partículas y de una toxina celular para facilitar el tratamiento de un tumor sólido de una manera localizada como se define en las reivindicaciones. Esta coadministración es útil en una serie de tratamientos terapéuticos incluyendo el tratamiento de tumores primarios y metastásicos.

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas por el autor en esta memoria descriptiva se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

Los tumores malignos, o cánceres, crecen de una manera incontrolada, invaden los tejidos normales y con frecuencia metastatizan y crecen en sitios alejados del tejido de origen. En general, los cánceres proceden de una o solamente unas pocas células normales que se han sometido a un proceso poco entendido denominado transformación maligna. Los cánceres pueden aparecer casi en cualquier tejido del cuerpo. Los derivados de células epiteliales, denominados carcinomas, son los tipos más comunes de cánceres. Los sarcomas son tumores malignos de tejidos mesenquimáticos, que surgen a partir de células tales como fibroblastos, células musculares y células adiposas. Los tumores sólidos malignos de tejidos linfáticos se denominan linfomas y los tumores malignos de linfocitos y otras células hematopoyéticas originados en la médula o en la sangre se denominan leucemias.

El cáncer es una de las tres causas principales de muerte en las naciones industrializadas. Según mejoran los tratamientos para las enfermedades infecciosas y continúa mejorando la prevención de enfermedades cardiovasculares, y aumenta la esperanza media de vida, probablemente el cáncer se está convirtiendo en la enfermedad fatal más común en estos países. Por lo tanto, el tratamiento satisfactorio del cáncer requiere que se eliminen o destruyan todas las células malignas sin matar al paciente. Una forma ideal de conseguir esto sería inducir una respuesta inmunitaria contra el tumor que distinga entre las células del tumor y sus homólogos celulares normales. Sin embargo, se ha intentado aplicar enfoques inmunológicos al tratamiento del cáncer durante más de un siglo con resultados insostenibles.

Por consiguiente, los métodos actuales de tratamiento del cáncer continúan siguiendo el protocolo usado desde hace mucho tiempo de escisión quirúrgica (si es posible) seguida de radioterapia y/o quimioterapia, si es necesario. La tasa de éxito de esta forma bastante ruda de tratamiento es extremadamente variable, pero generalmente se reduce significativamente según avanza y metastatiza el tumor. Además, estos tratamientos están asociados con efectos secundarios severos entre los que se incluyen desfiguración y cicatrización por la cirugía (por ejemplo, mastectomía o amputación de miembros), náuseas y vómitos severos por la quimioterapia y, lo que es más significativo, lesiones en tejidos normales tales como los folículos pilosos, el sistema digestivo y la médula ósea que se inducen como resultado del mecanismo de dirección relativamente no específico de los fármacos tóxicos que forman parte de la mayoría de los tratamientos de cáncer y es un importante factor limitante para la dosificación.

Además, los fármacos quimioterapéuticos comunes no penetran significativamente en los tejidos más allá de aproximadamente 70 micrómetros desde el torrente sanguíneo (Primeau *et al.* Clin. Canc. Res. 2005, 11: 8782-8788; Minchinton *et al.* Nat. Rev. Cancer 2006, 6: 583-592). El rápido crecimiento y el débil desarrollo vascular de la mayoría de los tumores sólidos ponen a muchas células tumorales fuera de la capacidad de los fármacos para penetrar el tejido. Críticamente, muchas células experimentan dosis subletales, lo que les permite sobrevivir y desarrollar resistencia a fármacos.

Los tumores sólidos producen el mayor número de muertes por cáncer y comprenden principalmente tumores de los revestimientos del árbol bronquial y del tracto alimentario que se conocen como carcinomas. En el año 2000 en Australia, el cáncer representaba el 30 % de las muertes de hombres y el 25 % de las muertes de mujeres (Cáncer en Australia 2000, 2003) y representaba el 24 % de las muertes de hombres y el 22 % de las muertes de mujeres en Estados Unidos en el año 2001 (Arias *et al.* 2003, National Vital Statistics Reports 52: 111-115). Los tumores sólidos normalmente no son curables una vez que se han extendido o "metastatizado" a lo largo del cuerpo. El pronóstico de tumores sólidos metastásicos ha mejorado solo marginalmente en los últimos 50 años. La mejor posibilidad para la cura de un tumor sólido sigue estando en el uso de tratamientos locales tales como cirugía y/o radioterapia cuando el tumor sólido está localizado en su revestimiento de origen y no se ha extendido a los ganglios linfáticos que drenan el tumor u otras partes. Sin embargo, incluso en este estadio temprano, y particularmente si el tumor se ha extendido a los ganglios linfáticos drenantes, pueden ya haberse extendido a lo largo del cuerpo depósitos microscópicos de cáncer conocidos como micrometástasis y posteriormente conducirán a la muerte del paciente. En este sentido, el cáncer es una enfermedad sistémica que requiere tratamientos administrados sistémicamente. De los pacientes que reciben cirugía y/o radioterapia como tratamiento local definitivo para su tumor primario y que

tienen micrometástasis, una pequeña proporción pueden curarse o al menos conseguir una remisión duradera del cáncer mediante la adición de tratamientos sistémicos adyuvantes tales como quimioterapia citotóxica u hormonas.

5 Convencionalmente, el cáncer sólido se ha tratado localmente con cirugía y/o radioterapia y, durante su estadio metastásico, con fármacos citotóxicos administrados sistémicamente que, con frecuencia, interfieren con el ciclo celular tanto de las células normales como de las células malignas. La selectividad relativa de este enfoque para el tratamiento de tejidos malignos se basa en alguna medida en la recuperación más rápida de los tejidos normales de las lesiones debidas a fármacos citotóxicos. Más recientemente, la terapia dirigida del cáncer ha pretendido mejorar la relación terapéutica del tratamiento del cáncer mejorando su especificidad y/o precisión de liberación en tejidos malignos al mismo tiempo que se minimizan las consecuencias adversas en los tejidos normales no malignos. Dos de las clases principales de terapia dirigida son (i) los inhibidores de molécula pequeña tales como inhibidores de tirosina quinasa mesilato de imatinib (Glivec®), gefitinib (Iressa®) y erlotinib (Tarceva®) y (ii) los anticuerpos monoclonales (mAb) tales como rituximab (Mabthera®) y trastuzumab (Herceptin®).

15 En paralelo con el desarrollo de terapias dirigidas, la combinación de al menos dos tratamientos anticancerosos convencionales tales como quimioterapia y radioterapia de nuevas formas ha sido otro enfoque al desarrollo de agentes terapéuticos para el cáncer. Al explotar interacciones sinérgicas entre las diferentes modalidades de tratamiento, el tratamiento de modalidad combinada pretende mejorar la eficacia del tratamiento de forma que la relación terapéutica para el tratamiento combinado sea superior a la de cada uno de los tratamientos individuales.

20 El tratamiento de modalidad combinada que usa radiación con haces externos y fármacos quimioterapéuticos de radiosensibilización tales como 5-fluorouracilo y cisplatino (quimiorradioterapia) ha mejorado la supervivencia en varios tumores sólidos tales como los de cabeza y cuello, pulmón, esófago, estómago, páncreas y recto debido tanto al mejor control tumoral local como a las menores tasas de fallo distante (TS Lawrence. *Oncology* (Huntington) 17: 23-28, 2003). Aunque los fármacos de radiosensibilización aumentan la respuesta tumoral, también aumentan la toxicidad en tejidos normales adyacentes, lo cual ocurre especialmente con los potentes radiosensibilizadores de nueva generación, gemcitabina y docetaxel. Sin embargo, la reducción del volumen de radiación permite que las dosis citotóxicas de gemcitabina se toleren mejor clínicamente (Lawrence 2003, citado anteriormente). La quimiorradioterapia puede solucionar mecanismos de resistencia mutuamente reforzantes, que solo pueden manifestarse *in vivo*.

35 La radioinmunoterapia (RIT) es un tratamiento sistémico que aprovecha la especificidad y avidéz de la interacción antígeno-anticuerpo para liberar dosis letales de radiación en células que llevan el antígeno diana. Normalmente se usan radioisótopos que emiten partículas β (por ejemplo, $^{131}\text{Yodo}$, $^{90}\text{Itrio}$, $^{188}\text{Renio}$ y $^{67}\text{Cobre}$) para marcar anticuerpos monoclonales (mAb) para aplicaciones terapéuticas. La energía de la radiación β se libera a una intensidad relativamente baja a lo largo de distancias medidas en milímetros (Waldmann, *Science* 252: 1657-1662, 1991; Bender *et al.*, *Cancer Research* 52: 121-126, 1992; O'Donoghue *et al.* *Journal of Nuclear Medicine* 36: 1902-1909, 1995; Griffiths *et al.* *International Journal of Cancer* 81: 985-992, 1999). De esta manera, los emisores β de alta energía tales como $^{90}\text{Itrio}$ son útiles para el tratamiento de tumores sólidos más grandes y heterogéneos (Liu *et al.*, *Bioconjugate Chemistry* 12: 7-34, 2001). El interés de la investigación en radioinmunoterapia se ha reavivado porque, a pesar de las bajas dosis de radiación liberadas, se han observado efectos biológicos significativos e inesperados de la RIT sobre células hospedadoras circundantes (Xue *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13765-13770, 2002). Además, la dosis menor pero biológicamente eficaz de radiación administrada por RIT tenía mayores efectos citocidas que una dosis mayor de radiación transmitida como radioterapia de haz externo (Dadachova *et al.*, *PNAS* 101: 14865-14870, 2004). Sin embargo, la eficacia del RIT como tratamiento para tumores sólidos puede verse obstaculizada por la baja penetración de anticuerpo a través de las barreras de tejido que rodean al antígeno diana en el tumor, lo cual, por consiguiente, ampliará la semivida circulatoria del anticuerpo (Britz-Cunningham *et al.* *Journal of Nuclear Medicine* 44: 1945-1961, 2003). Además, la RIT con frecuencia se ve obstaculizada por la heterogeneidad de la expresión del antígeno diana dentro del tumor. Así pues, aunque la RIT produce la dirección de moléculas a células tumorales, la mayor limitación de la RIT sigue siendo la toxicidad que puede producirse como resultado de grandes dosis de radiación que se liberan sistémicamente para conseguir una dirección suficiente (Britz-Cunningham *et al.* 2003, citado anteriormente; Christiansen *et al.* *Molecular Cancer Therapy* 3: 1493-1501, 2004). Realmente, ha resultado difícil conseguir clínicamente un índice terapéutico útil usando RIT (Sellers *et al.*, *Journal of Clinical Investigation* 104: 1655-1666, 1999).

60 Los antígenos asociados a tumores, que permitirían el establecimiento diferencial de esos tumores como diana al mismo tiempo que se respetan las células normales, también han sido el foco de la investigación del cáncer. Aunque abundantes antígenos ubicuos pueden proporcionar una diana más concentrada y accesible para la RIT, los estudios que adoptan esto han sido extremadamente limitados.

65 El desarrollo de la tecnología de nanopartículas también se aclamó como una nueva frontera excitante en términos del desarrollo de tratamientos para el cáncer nuevos y eficaces. Sin embargo, aunque los intentos previos de usar material en forma de partículas, tales como nanopartículas, para establecer como dianas tumores con fines de diagnóstico o terapéuticos han sido considerables, lamentablemente, en el contexto de los agentes terapéuticos ha habido un éxito mínimo. Desde el punto de vista del diagnóstico, la penetración relativamente superficial de las

partículas en el tumor ha sido suficiente para conseguir el objetivo de visualizar el tumor. Sin embargo, en términos de la liberación de un agente terapéutico, tal penetración superficial no ha sido suficiente para liberar eficazmente el agente por todo el tumor, en particular en el interior del tumor, lo cual sería necesario si se desea conseguir la destrucción total del tumor. En relación con la terapia, específicamente, la conjugación de partículas con una amplia
5 diversidad de materiales diferentes, hasta ahora no ha podido cumplir la promesa de conseguir una penetración eficaz en el tumor, siendo esto un prerrequisito esencial para que un agente terapéutico tenga cualquier probabilidad de eficacia. El documento WO-A-2009031859 desvela nanopartículas para su uso simultáneo en terapia y diagnóstico del cáncer, que comprenden un núcleo generador de señales, una cubierta externa polimérica soluble en agua que comprende un sitio de anclaje a la superficie y un sitio de unión a fármacos, un fármaco y opcionalmente
10 un resto de dirección. Qin *et al.*, desvelan en J. Mat. Chem., 21, septiembre de 2011, 18003-18010, nanopartículas de TiO₂ altamente dispersables en agua que tienen grupos TETT en su superficie con grupos -COOH libres, sobre las cuales puede cargarse doxorubicina a través de enlaces covalentes o no covalentes.

También se ha realizado un esfuerzo significativo para aprovechar el efecto de la mayor permeabilidad y retención (EPR) de los tumores como medio para desarrollar un agente terapéutico eficaz. Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, este es un fenómeno bien descrito basado en la noción de que ciertos tamaños de moléculas, típicamente liposomas o fármacos macromoleculares, tienden a acumularse preferentemente en el tejido tumoral. La explicación general de este fenómeno es que, para que las células tumorales crezcan rápidamente, tienen que estimular la producción de vasos sanguíneos. El VEGF y otros factores de crecimiento están implicados
15 en la angiogénesis del cáncer. Los agregados de células tumorales de tamaños de tan solo 150-200 µm se vuelven dependientes del suministro de sangre aportado por el sistema neovascular para su suplemento nutricional y de oxígeno. Estos vasos tumorales recién formados normalmente son anómalos en forma y arquitectura. Comprenden células epiteliales defectuosas y mal alineadas con amplias fenestraciones, que carecen de capa de músculo liso, o inervación con un lumen más ancho, y receptores funcionales para la angiotensina II alterados. Además, los tejidos tumorales normalmente carecen de drenaje linfático eficaz. Todos estos factores conducirán a una dinámica anómala de transporte molecular y de fluidos, especialmente en el caso de fármacos macromoleculares. Por consiguiente, se ha pensado que una forma de conseguir la dirección selectiva de fármacos a tumores sólidos es explotar estas anomalías del sistema vascular de los tumores en términos de la liberación activa y selectiva de fármacos anticancerosos en tejidos tumorales, definiendo en particular el efecto EPR de fármacos macromoleculares
20 en tumores sólidos. Debido a su gran tamaño molecular, los fármacos anticancerosos macromoleculares del tamaño de nanopartículas administrados por vía intravenosa escapan al aclaramiento renal. Con frecuencia no pueden penetrar en las estrechas uniones endoteliales de los vasos sanguíneos normales, pero pueden extravasarse al sistema vascular del tumor y quedar atrapados en las proximidades del tumor. Sin embargo, el efecto EPR no se ha aprovechado de forma eficaz o satisfactoria.

Se han diseñado diversas nanopartículas destinadas a conseguir una endocitosis celular eficaz. Sin embargo, aunque esto se podría conseguir, el problema de la penetración en el tejido sigue siendo un asunto separado que, hasta la fecha, no se ha solucionado de forma satisfactoria. La noción general del uso de una nanopartícula como vector para la liberación de un fármaco se analiza ampliamente en la bibliografía, pero si no se consigue una
25 penetración tumoral profunda, tiene un valor limitado.

Aunque se consiga la distribución eficaz de un fármaco en el tumor (por cualquier medio), un problema adicional ha sido el hecho de que las células neoplásicas del interior de los tumores sólidos pueden presentar un metabolismo ralentizado. Esto significa que, aunque un fármaco citotóxico penetre en estas células, si no se metaboliza eficazmente, tendrá un impacto limitado sobre la viabilidad del tumor.
30

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad urgente y en curso de desarrollar terapias sistémicas mejoradas para cánceres sólidos, en particular cánceres metastásicos.

En el trabajo que conduce a la presente invención, se ha determinado que el material en forma de partículas que se mantiene en un estado dispersado por un estabilizador puede conseguir una penetración más profunda en modelos de tumor sólido de lo que se ha podido conseguir previamente usando la tecnología de nanopartículas. Esto ha permitido el desarrollo de un medio eficaz para tratar tumores sólidos, tanto primarios como metastásicos, basándose en la coadministración de una toxina celular con el material en forma de partículas. Mediante la liberación
35 secuencial o simultánea de esta toxina, se consigue una penetración más profunda y, por lo tanto, una exposición celular más extensiva a la toxina. Gracias al aclaramiento reticuloendotelial menos eficaz que está asociado con los tumores, se consigue eficazmente una forma de tratamiento dirigido. Además, se ha observado que la captación de toxinas por tumores penetrados por las partículas de la presente invención es eficaz, lo que sugiere la regulación positiva del metabolismo de las células tumorales. Por consiguiente, la presente invención proporciona un medio para conseguir una liberación y captación localizada más eficaz de una toxina celular en un tumor y sus metástasis de una manera que se caracteriza por resultados mejorados significativamente y/o efectos secundarios reducidos con respecto a los que se esperarían normalmente en el contexto de un tratamiento convencional de un tipo de tumor equivalente. Este es un desarrollo extremadamente significativo, ya que los protocolos actuales dirigidos al tratamiento de enfermedades metastásicas se basan en la liberación sistémica no dirigida de agentes
40 quimioterapéuticos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un material en forma de partículas y una toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido como se define en las reivindicaciones. La materia objeto que no se incluye por las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que se proporcionan más adelante, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra “comprende” y variaciones tales como “comprender” y “que comprende”, implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Como se usa en el presente documento, se considerará que la expresión “derivado de” indica que un número entero o grupo de números enteros particular se ha originado a partir de la especie especificada, pero no se ha obtenido necesariamente de forma directa a partir de la fuente especificada. Además, como se usa en el presente documento, las formas singulares de “un”, “una” y “el”, “la” incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, comprendiendo dicho método coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un material en forma de partículas y una toxina celular durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina a dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador; y
- (ii) dicho estabilizador comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas, y (b) es diferente del resto del estabilizador;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetra en dicho tumor sólido.

Por comodidad, dicho material en forma de partículas que se mantiene en el estado dispersado por un estabilizador puede denominarse en el presente documento “material en forma de partículas estabilizado”.

En un aspecto de la divulgación, el estabilizador es un estabilizador estérico, comprendiendo dicho estabilizador estérico un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas.

Por lo tanto, el método puede comprender coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un material en forma de partículas y una toxina celular durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina a dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
- (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

En una realización, dicho tumor sólido es benigno.

En una realización adicional, dicho tumor es maligno.

En otra realización adicional, dicha parte de anclaje es un segmento polimérico de anclaje. En ese caso, dicho estabilizador comprende un segmento polimérico de anclaje, o dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y un segmento polimérico de anclaje.

En una realización adicional, dicho estabilizador comprende una parte de anclaje, derivando uno o los dos del estabilizador o parte de anclaje de uno o más monómeros etilénicamente insaturados que se han polimerizado por una técnica de polimerización viva, en donde la parte de anclaje es diferente del resto del estabilizador, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas. De acuerdo con esta realización, la parte de anclaje puede denominarse segmento polimérico de anclaje.

En otra realización, dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y un segmento polimérico de anclaje, de los que uno o los dos proceden de uno o más monómeros etilénicamente insaturados que se han polimerizado por una técnica de polimerización viva, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente del segmento polimérico de anclaje, y en donde el segmento polimérico de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un tumor sólido maligno en un sujeto, comprendiendo dicho método coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de material en forma de partículas y una toxina celular durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina a dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador; y
- (ii) dicho estabilizador comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas y (b) es diferente del resto del estabilizador;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

Cuando el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, el método para tratar un tumor sólido maligno en un sujeto comprende coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de material en forma de partículas y una toxina celular durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina a dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
- (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

En una realización, dicho tumor sólido maligno es un tumor sólido maligno metastásico. La referencia a "metastásico" debe entenderse como una referencia a un tumor que ha experimentado metástasis o puede haber experimentado metástasis.

En otra realización, dicho tumor sólido maligno es un tumor del sistema nervioso central, retinoblastoma, neuroblastoma, tumor pediátrico, cáncer de cabeza y cuello tal como cáncer de células escamosas, cáncer de mama y próstata, cáncer de pulmón, cánceres de riñón, tales como adenocarcinoma de células renales, cáncer esofagogástrico, carcinoma hepatocelular, neoplasia pancreatociliar, tal como adenocarcinomas y tumores de células de islotes, cáncer colorrectal, cáncer cervical, cáncer anal, cáncer del tracto uterino o de otra parte del tracto reproductor, cáncer del tracto urinario, tal como de uréter o vejiga, tumor de células germinales tal como tumor de células germinales testiculares o tumor de células germinales de ovario, cáncer de ovario, tal como un cáncer epitelial de ovario, carcinoma de tumor primario desconocido, malignidad asociada a inmunodeficiencia humana, tal como sarcoma de Kaposi, linfoma, leucemia, melanoma maligno, sarcoma, tumor endocrino, tal como de la glándula tiroides, mesotelioma u otros tumores pleurales o peritoneales, tumores neuroendocrinos o tumor carcinoide.

Por "coadministración" se entiende que el material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular se administran como entidades separadas por sí mismos. En otras palabras, en el momento de la administración, el material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular no se acoplan de forma covalente o químicamente entre sí.

La coadministración del material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular en el contexto de la presente invención incluye la administración tanto simultánea como secuencial. La administración simultánea incluye cuando el material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular están presentes en dos formulaciones diferentes, pero ambas se administran sustancialmente al mismo tiempo. En el caso de la administración secuencial, se usa un procedimiento de múltiples etapas en el que el material en forma de partículas estabilizado se administra en una etapa y la toxina celular se administra en un momento diferente en una etapa separada. La toxina celular puede administrarse antes de la administración del material en forma de partículas estabilizado. La diferencia en tiempo entre la administración del material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular en la administración secuencial puede variar, pero generalmente variará de aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 4 días, por ejemplo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora.

En una administración secuencial, el material en forma de partículas estabilizado generalmente se administrará antes de la toxina celular.

El material en forma de partículas y la toxina celular pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, una vez que el material en forma de partículas ha penetrado en el tumor, también se consigue la penetración eficaz de la toxina celular administrada.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, comprendiendo dicho método:

(a) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un material en forma de partículas y durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas en dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador; y
- (ii) dicho estabilizador comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas y (b) es diferente del resto del estabilizador; y

(b) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una toxina celular posteriormente a la administración de dicho material en forma de partículas;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

Cuando el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, el método para tratar un tumor sólido en un sujeto comprende:

(a) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un material en forma de partículas y durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas en dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
- (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas; y

(b) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una toxina celular después de la administración de dicho material en forma de partículas;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

En otro aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, comprendiendo dicho método coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de material en forma de partículas y un agente citostático o citocida durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina en dicho tumor, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador; y
- (ii) dicho estabilizador comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas y (b) es diferente del resto del estabilizador;

y en donde dicho material en forma de partículas y dicho agente citostático o citocida penetra en dicho tumor sólido.

La presente invención se refiere a un material en forma de partículas y una toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido, en donde

- (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
- (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas;

en donde dicho segmento polimérico de estabilización estérica es soluble en dicho vehículo líquido y comprende un grupo funcional iónico terminal, particularmente en donde el grupo funcional iónico es un catión; en donde dicho material en forma de partículas varía en tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 350 nm; en donde dicho material en forma de partículas y dicha toxina celular se coadministran en dos formulaciones separadas; en
 5 donde dicha toxina celular es un agente citostático o citocida seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y 5-FU; y en donde dicho material en forma de partículas y dicho agente citostático o citocida penetran en dicho tumor sólido.

10 De acuerdo con la presente invención, los agentes citostáticos se seleccionan entre doxorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y 5-FU.

El material en forma de partículas y/o el estabilizador pueden acoplarse a un ligando para efectuar una dirección más específica a un tumor. Esto no será aplicable necesariamente en todas las situaciones, pero en la medida en
 15 que exista una molécula diana apropiada para un tumor dado, esto puede proporcionar una especificidad útil adicional.

De acuerdo con dicha realización, se proporciona un material en forma de partículas y una toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido de acuerdo con la reivindicación 1; en donde el material en forma de partículas y/o el estabilizador está ligado, unido o asociado de otra manera con un ligando dirigido a una molécula tumoral y en
 20 donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

En un aspecto de la divulgación, en el que el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, también se proporciona un método para tratar un tumor sólido en un
 25 sujeto, comprendiendo dicho método coadministrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de material en forma de partículas y una toxina celular durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para facilitar la distribución de dicho material en forma de partículas y toxina a dicho tumor, en donde:

- 30 (i) dicho material en forma de partículas se administra en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
 (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en
 35 donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas;

en donde el material en forma de partículas y/o el estabilizador estérico está ligado, unido o asociado de otra manera con un ligando dirigido a una molécula tumoral y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

40 En otro aspecto, se proporciona el uso de un material en forma de partículas y una toxina celular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas está en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador; y
 45 (ii) dicho estabilizador comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas, y (b) es diferente del resto del estabilizador;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

50 Cuando el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, se proporciona el uso de un material en forma de partículas y una toxina celular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido, en donde:

- (i) dicho material en forma de partículas está en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador estérico; y
 (ii) dicho estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje, y en
 60 donde la parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas;

y en donde dicho material en forma de partículas y toxina penetran en dicho tumor sólido.

Otros aspectos y/o realizaciones de la invención se analizan con más detalle más adelante.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: las nanopartículas estabilizadas estéricamente pueden penetrar en esferoides. Imágenes TEM en la acumulación de partículas NP2 en esferoides. Las flechas indican áreas de acumulación de nanopartículas. La región recuadrada está ampliada y se muestra en la imagen a la derecha. Las barras de escala son como se indican.
- 10 Figura 2: las nanopartículas pueden influir en la difusión de compuestos activos fluorescentes. Coadministración de los compuestos activos fluorescentes a) doxorubicina y b) mitoxantrona con nanopartículas de los ejemplos 2, 3 y 5. Imágenes confocales individuales de difusión de fármacos fluorescentes en esferoides DLD-1. Barra de escala 200 μm .
- 15 Figura 3: la mayoría de las nanopartículas ensayadas no afectaban a la excrecencia celular a partir de esferoides. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 1, 2, 4, 8, 9, 12, 13, 15, 16 y 18. Las barras de error representan error típico.
- 20 Figura 4: la composición del núcleo de las nanopartículas no influye en la eficacia de las nanopartículas. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas de los ejemplos 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18, coadministradas con doxorubicina. Los esferoides de control no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Las barras de error representan el error típico.
- 25 Figura 5: el tamaño de las nanopartículas no se correlaciona con la eficacia de las nanopartículas. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18 coadministradas con doxorubicina. Los esferoides de control no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Las barras de error representan el error típico.
- 30 Figura 6: las nanopartículas estabilizadas con polímero funcionalizado con amina al 5-10 % aumentan la eficacia de la doxorubicina. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22 y 24, coadministradas con doxorubicina. Los esferoides de control no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Las barras de error representan el error típico.
- 35 Figura 7: eficacia de la coadministración de NP con recubrimientos de grupos terminales de estabilizador funcionalizado con amina al 5 % con diferentes núcleos y doxorubicina en comparación con doxorubicina sola. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 8, 9 y 12 coadministradas con doxorubicina. Los esferoides de control no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Las barras de error representan el error típico.
- 40 Figura 8: efecto de los compuestos activos cuando se coadministran con nanopartículas sobre la viabilidad de esferoides obtenidos a partir de dos líneas de células cancerosas diferentes. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4 y 5 coadministradas con compuestos activos (Tabla 2). Los esferoides de control DLD-1 no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Los esferoides de control PA-1 no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 294 % \pm 21. Las barras de error representan el error típico.
- 45 Figura 9: efecto de la administración retrasada del compuesto activo en comparación con la coadministración del compuesto activo y nanopartículas. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4 y 5. Los esferoides DLD-1 eran nanopartículas y compuesto activo coadministrados (barras de color gris claro) o nanopartículas administradas y después tratadas, 24 horas después, con compuesto activo (barras de color gris oscuro). Los esferoides de control DLD-1 no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 331 % \pm 23. Las barras de error representan el error típico.
- 50 Figura 10: efecto de la administración retrasada de compuesto activo en comparación con la coadministración de compuesto activo y nanopartículas. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4 y 5. Los esferoides PA-1 eran nanopartículas y compuesto activo coadministrados (barras de color gris claro) o nanopartículas administradas y después tratadas, 24 horas después, con compuesto activo (barras de color gris oscuro). Los esferoides de control PA-1 no tratados tenían un valor de excrecencia normalizada de 294 % \pm 21. Las barras de error representan el error típico.
- 55 Figura 11: las combinaciones de nanopartícula y principio activo coadministrados más eficaces para células DLD-1 y PA-1. Gráfico de excrecencia celular normalizada como se describe en el ejemplo 29 de las nanopartículas
- 60
- 65

indicadas en los ejemplos 2, 5, 14, 20, 21 y 22, coadministradas con compuestos activos en esferoides DLD-1 (a) y esferoides PA-1 (b). Las barras de error representan el error típico.

Figura 12: la coadministración de NP2, pero no NP19 o NP23, con doxorubicina promueve la difusión de doxorubicina a través del esferoide. Imágenes confocales de difusión de doxorubicina en esferoides tratados con doxorubicina 1 μM y las nanopartículas cuando se indica. Barra de escala 200 μm .

La Figura 13 muestra una ilustración esquemática del material en forma de partículas estabilizado que puede usarse de acuerdo con la presente invención.

La Figura 14 muestra una ilustración esquemática del material en forma de partículas estabilizado que puede usarse de acuerdo con la presente invención.

La Figura 15 muestra una ilustración esquemática que muestra el volumen hidrodinámico de un material en forma de partículas estabilizado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está basada, en parte, en la determinación de que un material en forma de partículas que se mantiene en un estado dispersado por un cierto tipo de estabilizador puede conseguir una penetración más profunda y más eficaz en un tumor sólido de lo que se podía conseguir previamente usando la tecnología de partículas. La naturaleza de la penetración efectuada por estos materiales en forma de partículas ha conseguido tanto una distribución celular significativamente más amplia, dentro del tumor, de la toxina coadministrada con el material en forma de partículas como, además, una inducción más eficaz de la toxicidad celular. Como el aclaramiento reticuloendotelial de los sitios de los tumores es significativamente menos eficaz que en los tejidos normales, el método de la invención permite no solo una penetración del tumor más eficaz, sino además la liberación de menores concentraciones de toxinas celulares que pueden localizarse, y por lo tanto concentrarse, en los sitios tumorales.

Esto reduce los efectos secundarios que podrían aparecer en el contexto de la quimioterapia sistémica convencional en la que dicho tratamiento se administraría a la máxima dosis que puede tolerarse por el paciente y, además, con frecuencia en el contexto de múltiples ciclos repetidos durante un período de meses. Este desarrollo ahora proporciona un medio realista para apartarse del tratamiento de los tumores primarios y la enfermedad metastásica mediante la liberación sistémica no dirigida de quimioterapia.

La referencia a un "tumor sólido" en el presente documento debe considerarse una referencia a una masa encapsulada o no encapsulada u otra forma de crecimiento o agregado celular que comprende células neoplásicas. La referencia a una "célula neoplásica" debe entenderse como una referencia a una célula que presenta un crecimiento anómalo. El término "crecimiento" debe entenderse en su sentido más amplio e incluye la referencia a la proliferación. La frase "crecimiento anómalo" en este contexto se entiende como una referencia al crecimiento celular que, con respecto al crecimiento celular normal, presenta uno o más de un aumento en la tasa de división celular, un aumento en el número de divisiones celulares, una reducción en la duración del período de división celular, un aumento en la frecuencia de períodos de división celular o proliferación incontrolada y evasión de la apoptosis. El significado médico común del término "neoplasia" se refiere a un nuevo crecimiento celular que tiene como resultado una pérdida de capacidad de respuesta a los controles de crecimiento normales, por ejemplo, al crecimiento de células neoplásicas. Las neoplasias incluyen "tumores" que pueden ser benignos, premalignos o malignos. El término "neoplasma" debe considerarse una referencia a una lesión, tumor u otra masa encapsulada o no encapsulada u otra forma de crecimiento o agregado celular que comprende células neoplásicas.

Debe considerarse que el término "neoplasma", en el contexto de la presente invención, incluye la referencia a todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna independientemente del tipo histopatológico o estado de invasión.

El término "carcinoma" se reconoce por los expertos en la materia y se refiere a malignidades de tejidos epiteliales o endocrinos incluyendo carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Los carcinomas ejemplares incluyen los que se forman a partir del tejido de la mama. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado del tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles.

Las células neoplásicas que comprenden el neoplasma pueden ser cualquier tipo celular, derivado de cualquier tejido, tal como una célula epitelial o no epitelial. Los ejemplos de neoplasmas y células neoplásicas abarcadas por la presente invención incluyen, pero sin limitación, tumores del sistema nervioso central, retinoblastoma, neuroblastoma y otros tumores pediátricos, cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, cánceres de células escamosas), cánceres de mama y próstata, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón tanto microcítico como no microcítico), cánceres renales (por ejemplo, adenocarcinoma de células renales), cánceres esofagogástricos,

carcinoma hepatocelular, neoplasias pancreaticobiliares (por ejemplo, adenocarcinomas y tumores de células de los islotes), cáncer colorrectal, cánceres cervicales y anales, cánceres uterino y de otras partes del tracto reproductor, cánceres del tracto urinario (por ejemplo, de uréter y vejiga), tumores de células germinales (por ejemplo, tumores de células germinales testiculares o tumores de células germinales de ovario), cáncer de ovario (por ejemplo

5 cánceres epiteliales de ovario), carcinomas de tumor primario desconocido, malignidades asociadas con la inmunodeficiencia humana (por ejemplo Sarcoma de Kaposi), linfomas, melanomas malignos, sarcomas, tumores endocrinos (por ejemplo, de la glándula tiroides), mesotelioma y otros tumores pleurales o peritoneales, tumores neuroendocrinos y tumores carcinoides.

10 Preferentemente, la presente invención se refiere al tratamiento de una afección neoplásica maligna e, incluso más preferentemente, a una afección neoplásica metastásica. Se apreciará que, aunque el método de la invención puede aplicarse al tratamiento de cualquier neoplasma, es particularmente útil en términos del tratamiento de neoplasmas metastatizados. Los tumores primarios no metastatizados se pueden tratar por la invención o por regímenes de

15 tratamiento convencionales tales como escisión quirúrgica del tumor o radioterapia. Sin embargo, los tumores que han metastatizado no son curables por ninguno de estos regímenes de tratamiento convencionales debido a la propagación y crecimiento con frecuencia considerable de nódulos metastáticos. Por consiguiente, dichas afecciones actualmente solo se pueden tratar mediante la administración de quimioterapia sistémica, causando este régimen de tratamiento con frecuencia efectos secundarios severos para un potencial curativo limitado. Además, incluso en el contexto de tumores primarios que parecen no haber metastatizado, con frecuencia se sigue

20 recomendando quimioterapia después de la cirugía y radiación en caso de que se haya producido una extensión metastásica pero aún no es detectable. Esto es una práctica particularmente común en el contexto de cánceres que tradicionalmente se consideran agresivos, tales como cánceres de mama y colon. La presente invención ahora proporciona una alternativa a la aplicación de regímenes de tratamiento de quimioterapia sistémica agresivos. Como la administración sistémica del agente citotóxico de la presente invención puede liberarse de una forma más

25 localizada en tumores y se metaboliza más eficazmente por las células neoplásicas, la aparición de efectos secundarios puede minimizarse mediante la administración de dosis menores de la toxina celular.

En una realización, dicho tumor sólido es benigno.

30 En otra realización, dicho tumor sólido es maligno.

Preferentemente, dicho tumor sólido maligno es un tumor sólido maligno metastásico. La referencia a "metastásico" debe entenderse como una referencia a un tumor que ha experimentado metástasis o puede haber experimentado metástasis.

35 En una realización, dicho tumor sólido maligno es un tumor del sistema nervioso central, retinoblastoma, neuroblastoma, tumor pediátrico, cáncer de cabeza y cuello tal como cáncer de células escamosas, cáncer de mama y próstata, cáncer de pulmón, cánceres renales, tales como adenocarcinoma de células renales, cáncer esofagogástrico, carcinoma hepatocelular, neoplasia pancreaticobiliar, tal como adenocarcinomas y tumores de

40 células de islotes, cáncer colorrectal, cáncer cervical, cáncer anal, cáncer uterino o de otra parte del tracto reproductor, cáncer del tracto urinario, tal como de uréter o vejiga, tumor de células germinales tal como tumor de células germinales testiculares o tumor de células germinales de ovario, cáncer de ovario, tal como cáncer epitelial de ovario, carcinoma de tumor primario desconocido, malignidad asociada con la inmunodeficiencia humana, tal como sarcoma de Kaposi, linfoma, leucemia, melanoma maligno, sarcoma, tumor endocrino, tal como de la glándula

45 tiroides, mesotelioma u otro tumor pleural o peritoneal, tumor neuroendocrino o tumor carcinoide.

Como se ha detallado anteriormente en el presente documento, la presente invención se basa en la coadministración de una toxina celular con un material en forma de partículas estabilizado. Los intentos previos de

50 usar un material en forma de partículas, tales como nanopartículas, para establecer como diana tumores con fines de diagnóstico o terapéuticos ha sido considerable, pero en el contexto de los agentes terapéuticos, de un éxito mínimo. Con los diagnósticos, una penetración relativamente superficial de las partículas en el tumor ha sido suficiente para conseguir el objetivo de visualizar el tumor. Sin embargo, en términos de la liberación de un agente terapéutico, dicha penetración superficial no ha sido suficiente para liberar de forma eficaz el agente en todo el tumor, en particular en el interior del tumor. En relación con los agentes terapéuticos, específicamente, la

55 conjugación de partículas con una amplia diversidad de materiales diferentes ha fallado hasta ahora en el cumplimiento de la promesa de conseguir una penetración eficaz en el tumor, siendo esto un prerrequisito esencial para que un agente terapéutico tenga alguna probabilidad de eficacia.

También se han hecho esfuerzos significativos para aprovechar el mayor efecto de permeabilidad y retención (EPR)

60 de los tumores como medio para desarrollar un agente terapéutico eficaz. Este es un fenómeno bien descrito basado en la noción de que ciertos tamaños de moléculas, típicamente liposomas o fármacos macromoleculares, tienden a acumularse preferentemente en el tejido tumoral. La explicación general de este fenómeno es que, para que las células tumorales crezcan rápidamente, deben estimular la producción de vasos sanguíneos. El VEGF y otros factores de crecimiento están implicados en la angiogénesis del cáncer. Los agregados de células tumorales de

65 tamaños tan pequeños como 150-200 μm se vuelven dependientes del suministro sanguíneo llevado por el nuevo sistema vascular para su suministro de nutrientes y oxígeno. Estos vasos tumorales recién formados normalmente

son anómalos en forma y arquitectura. Comprenden células endoteliales defectuosas mal alineadas con amplias fenestraciones, careciendo de una capa de músculo liso, o inervación con una luz más amplia, y receptores funcionales alterados para la angiotensina II. Además, los tejidos tumorales normalmente carecen de un drenaje linfático eficaz. Todos estos factores llevarán a una dinámica molecular y de transporte de fluidos anómala, especialmente en el caso de los fármacos macromoleculares. Por consiguiente, se ha pensado que una forma de conseguir una dirección selectiva del fármaco hacia los tumores sólidos es explotar estas anomalías del sistema vascular del tumor en términos de la liberación activa y selectiva de fármacos anticancerosos en tejidos tumorales, definiendo notablemente el efecto EPR de los fármacos macromoleculares en tumores sólidos. Debido a su gran tamaño molecular, los fármacos anticancerosos macromoleculares del tamaño de nanopartículas administrados por vía intravenosa escapan a la eliminación renal. Con frecuencia no pueden penetrar en las uniones endoteliales estrechas de los vasos sanguíneos normales, pero pueden extravasarse en el sistema vascular del tumor y quedar atrapados en las proximidades del tumor. Sin embargo, el efecto EPR no se ha aprovechado de forma eficaz o satisfactoria.

Se han diseñado diversas nanopartículas que se dirigen a conseguir una endocitosis celular eficaz. Sin embargo, aunque esto pueda conseguirse, el asunto de la penetración en el tejido aún sigue siendo un problema aparte que, hasta la fecha, no se ha solucionado de forma satisfactoria. La noción general del uso de una nanopartícula como vector para la liberación de un fármaco se analiza ampliamente en la bibliografía, pero si no se consigue una penetración tumoral profunda, tiene un valor limitado.

Incluso cuando se consigue una distribución eficaz en el tumor de un fármaco (por cualquier medio), un problema adicional ha sido el hecho de que las células neoplásicas dentro de los tumores sólidos pueden presentar un metabolismo ralentizado. Esto significa que incluso si un fármaco citotóxico penetra en esas células, si no se metaboliza de forma eficaz tendrá un impacto limitado sobre la viabilidad del tumor

Se considera que la presente invención consigue sus resultados terapéuticos tanto mediante una penetración profunda del tumor por el material en forma de partículas, que de esta manera permite la penetración simultánea o secuencial por una toxina celular, como permitiendo el metabolismo eficaz de la toxina para conseguir la muerte celular. Además, sin limitar la presente invención de forma alguna, se considera que esto puede deberse al material en forma de partículas definido en el presente documento, gracias a su diseño, que actúa regulando positivamente el metabolismo celular que se ha ralentizado o está latente.

La toxina celular de la presente invención puede ser citostática o citocida y se selecciona del grupo que consiste en doxorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y 5-FU. Se apreciará por el experto en la materia que la presente invención puede diseñarse para liberar una toxina celular o múltiples toxinas celulares (es decir, un "cóctel" de fármacos). La decisión en relación a como es mejor proceder puede tomarse por el experto en la materia como un procedimiento rutinario. Por ejemplo, dependiendo del tipo de tumor, ciertos fármacos específicos o combinaciones de fármacos se consideran particularmente deseables para el uso. Se apreciará que el conjunto de conocimientos en relación con las características y uso de agentes citotóxicos es amplio y el experto en la materia podría diseñar un protocolo de administración para satisfacer los parámetros de la presente invención como un procedimiento rutinario.

Por lo tanto, la referencia a "toxina celular" en el presente documento debe entenderse como una referencia a cualquier agente seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y 5-FU.

El material en forma de partículas estabilizado de acuerdo con la invención puede mantenerse ventajosamente en un estado dispersado a bajas concentraciones. La capacidad del material en forma de partículas de permanecer en un estado dispersado en una serie diversa de vehículos líquidos (incluyendo fluidos corporales) a una concentración relativamente baja, junto con la capacidad de adaptar el diseño del estabilizador a nivel molecular (por ejemplo, su composición y peso molecular) puede, sin desear limitarse por ninguna teoría en particular, jugar un papel para permitir que el material en forma de partículas consiga la penetración profunda de tumores sólidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "material en forma de partículas" pretende incluir el material que es capaz de dispersarse por todo el vehículo líquido y que presenta una superficie a la que puede asociarse el estabilizador.

El material en forma de partículas de acuerdo con la invención varía en tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 350 nm.

En una realización, dicho material en forma de partículas es de aproximadamente: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 nm.

Al tener capacidad de dispersarse por todo el vehículo líquido, se apreciará que el material en forma de partículas será suficientemente insoluble en el vehículo líquido para permitir que la dispersión tenga una aplicación eficaz.

El material en forma de partículas puede estar en forma de partículas primarias, o en forma de una agregación de partículas primarias.

5 Para evitar cualquier duda, la referencia en el presente documento al “tamaño” del material en forma de partículas pretende denotar un tamaño medio (al menos aproximadamente el 50 % en número) de las partículas basándose en la mayor dimensión de una partícula dada. El tamaño del material en forma de partículas *per se* se determina en el presente documento por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

10 Para evitar cualquier duda, cuando el material en forma de partículas está en forma de una agregación de partículas primarias, la referencia al tamaño de dicho material pretende ser una referencia a la máxima dimensión del agregado, no a las partículas primarias que forman el agregado.

15 Aparte de tener utilidad medicinal en el contexto de la presente solicitud, no hay una limitación particular sobre la composición del material en forma de partículas. El material en forma de partículas puede tener una composición orgánica o una composición inorgánica o una combinación de las mismas. El material en forma de partículas puede ser inorgánico, orgánico o una combinación de los mismos.

20 Los ejemplos de material en forma de partículas incluyen uno o más de un metal, una aleación metálica, una sal metálica, un complejo metálico, un óxido metálico, un óxido inorgánico, un isótopo radiactivo, una partícula polimérica y/o combinaciones de los mismos.

25 Los ejemplos más específicos de materiales en forma de partículas incluyen oro, plata, boro y sales, complejos u óxidos de los mismos, carbonato cálcico, sulfato de bario, óxido de hierro, óxido de cromo, óxido de cobalto, óxido de manganeso, óxido de silicio, oxihidróxido de hierro, oxihidróxido de cromo, oxihidróxido de cobalto, oxihidróxido de manganeso, dióxido de cromo, óxidos de metales de transición, polímeros tales como poliestireno, poli(metacrilato de metilo) y poli(butadieno).

30 En algunas realizaciones de la invención, se prefiere que el material en forma de partículas sea magnético. El material en forma de partículas magnéticas que puede usarse de acuerdo con la invención generalmente tendrá un tamaño menor de aproximadamente 350 nm. Los expertos en la materia apreciarán que la composición y/o tamaño de las partículas puede influir en sus propiedades magnéticas. El material en forma de partículas magnéticas generalmente presentará propiedades ferromagnéticas, ferrimagnéticas o superparamagnéticas.

35 El tamaño específico del material en forma de partículas magnéticas usado generalmente se dictará por la aplicación deseada de las composiciones. Para algunas aplicaciones, puede ser deseable que el material en forma de partículas magnéticas tenga un tamaño menor de aproximadamente 300 nm, por ejemplo, menor de aproximadamente 100 nm o menor de aproximadamente 50 nm.

40 No hay una limitación particular sobre el tipo de material en forma de partículas magnéticas que puede usarse de acuerdo con la invención. Los ejemplos de materiales magnéticos adecuados incluyen, pero sin limitación, hierro, níquel, cromo, cobalto, óxidos de los mismos o mezclas de cualquiera de estos. Los materiales preferidos en forma de partículas magnéticas de óxido de hierro incluyen óxido de hierro γ (es decir γ -Fe₂O₃, también conocido como maghemita) y magnetita (Fe₃O₄).

45 En algunas aplicaciones, puede ser deseable usar un material magnético que es superparamagnético (es decir partículas nanosuperparamagnéticas). Como se usa en el presente documento, el término “superparamagnético” pretende hacer referencia a partículas magnéticas que no tienen las siguientes propiedades; (i) coercividad, (ii) remanencia o (iii) un ciclo de histéresis cuando la tasa de cambio de un campo magnético aplicado es casi estática.

50 El material magnético preferentemente se selecciona entre ferritas de fórmula general MO.Fe₂O₃ donde M es un metal bivalente tal como Fe, Co, Ni, Mn, Be, Mg, Ca, Ba, Sr, Cu, Zn, Pt o mezclas de los mismos, u óxidos del tipo de magnetoplumbita de fórmula general MO.6Fe₂O₃ donde M es un ion bivalente grande, hierro metálico, cobalto o níquel. Además, podrían ser partículas de Fe, Ni, Cr o Co puro u óxidos de éstos. Como alternativa, podrían ser mezclas de cualquiera de estos.

55 En una realización, el material en forma de partículas magnéticas es o comprende óxido de hierro tal como magnetita (Fe₃O₄) o maghemita (γ -Fe₂O₃) con un tamaño de partículas preferentemente menor de 50 nm, por ejemplo, entre 2 y 40 nm.

60 El material en forma de partículas usado de acuerdo con la invención convenientemente puede prepararse usando técnicas conocidas en este campo.

65 De acuerdo con la invención, el material en forma de partículas se mantiene en el estado dispersado por un estabilizador. Por “mantenerse”, en este contexto, se entiende que, en ausencia del estabilizador, el material en forma de partículas flocularía o sedimentaría en el vehículo líquido como un sedimento. En otras palabras, el estabilizador funciona reteniendo el material en forma de partículas en el estado dispersado.

El material en forma de partículas está en forma de una dispersión dentro de un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en el estado dispersado por un estabilizador. Por “estabilizador” se entiende un agente que se asocia con el material en forma de partículas y ayuda a impedir que flocule o se convierta de otra manera en no dispersado dentro del vehículo líquido.

5 El estabilizador usado de acuerdo con la invención comprende una parte de anclaje que (a) ancla el estabilizador al material en forma de partículas y (b) es diferente del resto del estabilizador.

10 Por una “parte de anclaje” se entiende un resto, tal como un átomo o grupo de átomos acoplados covalentemente que funciona anclando el estabilizador al material en forma de partículas.

Por parte de anclaje que “ancla” el estabilizador al material en forma de partículas se entiende que es la parte de anclaje *per se* que encadena o une directamente el estabilizador al material en forma de partículas.

15 La parte de anclaje, por lo tanto, une el estabilizador al material en forma de partículas.

No hay ninguna limitación particular en la forma en la que el estabilizador se ancla al material en forma de partículas. Por ejemplo, puede acoplarse covalentemente al material en forma de partículas y/o fijarse al material en forma de partículas a través de fuerzas electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno, carga iónica, fuerzas de van der Waals o cualquier combinación de los mismos.

20 El estabilizador funciona impidiendo que el material en forma de partículas flocule o pierda la dispersión de otra manera (es decir, se agregue) dentro del vehículo líquido a través de mecanismos conocidos tales como repulsión estérica, repulsión electrostérica y/o repulsión electrostática.

25 Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que el uso de un estabilizador de acuerdo con la invención facilita (i) el transporte del material en forma de partículas *in vivo* al sitio del tumor sólido, y/o (ii) la penetración del material en forma de partículas por todo el tumor sólido, y/o (iii) la captación por subpoblaciones de células dentro del tumor que de otra manera no acumularían dosis eficaces de la toxina celular.

30 Pueden usarse uno o más estabilizadores de acuerdo con la presente invención.

35 Por la parte de anclaje que es “diferente” del resto del estabilizador se entiende que la parte de anclaje tiene una estructura o composición molecular diferente de la del resto del estabilizador. En otras palabras, el estabilizador tendrá una parte de estabilización (es decir, la parte que funciona como resto de estabilización) y una parte de anclaje (es decir, la parte que funciona fijando o uniendo el estabilizador al material en forma de partículas). La parte de estabilización y la parte de anclaje son diferentes.

40 Al proporcionar el estabilizador con diferentes características estructurales que dan lugar a las funciones de estabilización y anclaje, se ha descubierto que puede mejorarse el efecto práctico de las dos funciones. Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que una fuerte asociación entre el material en forma de partículas y el estabilizador (proporcionada por la parte de anclaje), en combinación con un resto de estabilización especializado, permite que el material en forma de partículas se mantenga en un estado dispersado a lo largo de una serie diversa de vehículos líquidos a concentraciones muy bajas. Estas propiedades hacen que el material en forma de partículas sea muy adecuado para mantenerse en un estado dispersado después de la administración dentro de fluidos corporales.

50 Los expertos en la materia apreciarán que los estabilizadores con una parte de anclaje única pueden funcionar de forma diferente a los estabilizadores sin dicha parte de anclaje única. Por ejemplo, un estabilizador tal como polietilenglicol (PEG) puede adsorberse en la superficie de un material en forma de partículas y funcionar como estabilizador. En ese caso, cualquier parte de la cadena de PEG que no tenga una parte de anclaje que es diferente del resto del estabilizador se adsorberá de una forma aleatoria dando lugar a una capa de estabilización con superficie no uniforme.

55 Por el contrario, al proporcionar un estabilizador con una parte estabilizadora y una disposición de parte de anclaje diferente, puede formarse ventajosamente una capa estabilizadora de superficie más controlada y uniforme. Por ejemplo, la presencia de la única porción de anclaje puede promover en la superficie del material en forma de partículas una capa estabilizadora en cepillo, en la que la parte de anclaje está fijada a la superficie del material en forma de partículas y el resto del estabilizador (es decir, la parte estabilizadora) se extiende desde la superficie del material en forma de partículas al interior del soporte líquido, de forma similar a las cerdas que se extienden desde la superficie de un cepillo (de ahí el nombre de capa estabilizadora “de cepillo”). Como ejemplo, el estabilizador de PEG mencionado anteriormente podría funcionalizarse con uno o más grupos de ácido carboxílico en el extremo de la cadena de PEG para proporcionar una parte de anclaje. La parte de anclaje funcionalizada con ácido, que es diferente del resto del estabilizador, puede entonces fijar o unir la cadena de PEG al material en forma de partículas y permitir que se extienda libremente dentro del vehículo líquido.

Los estabilizadores adecuados pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos o bipolares. De acuerdo con la invención, el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde dicha parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas y es diferente del resto del estabilizador, y en donde dicho segmento polimérico estérico es soluble en el

vehículo líquido y comprende un grupo funcional iónico terminal, preferentemente un catión. En un aspecto de la divulgación, el material en forma de partículas se mantiene en el estado disperso por un estabilizador estérico, en donde el estabilizador estérico comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica es diferente de la parte de anclaje y en donde la parte de anclaje une el estabilizador al material en forma de partículas.

De una manera similar a lo indicado anteriormente, el segmento polimérico de estabilización estérica funciona estabilizando el material en forma de partículas dentro del vehículo líquido, y la parte de anclaje funciona fijando el estabilizador al material en forma de partículas. Al proporcionar al estabilizador diferentes características estructurales que dan lugar a las funciones de estabilización estérica y anclaje, se ha observado o que puede mejorarse el efecto práctico de las dos funciones.

De acuerdo con la invención, el estabilizador tiene un segmento de estabilización polimérico.

El segmento de estabilización será soluble en el vehículo líquido.

En una realización, el segmento de estabilización polimérico comprende un polímero seleccionado entre poli(acrilamida), óxido de polietileno, polihidroxietilacrilato, poli N-isopropilacrilamida, polidimetilaminoetilmetacrilato, polivinil pirrolidona y copolímeros de los mismos.

En otra realización, la parte de anclaje comprende uno o más grupos de ácido carboxílico, uno o más grupos fosfato, uno o más grupos fosfonato, uno o más grupos fosfinato, uno o más grupos tiol, uno o más grupos tiocarbonilo, uno o más grupos de ácido sulfúrico, uno o más grupos etoxisililo y combinaciones de los mismos.

En una realización, la parte de anclaje es un segmento polimérico de anclaje y al menos uno de los segmentos poliméricos de anclaje y estabilización estérica comprende un resto polimerizado de uno o más monómeros etilénicamente insaturados. Se cree que el empleo de al menos uno de dichos segmentos poliméricos aumenta las propiedades de estabilización del estabilizador estérico.

En una realización, la parte de anclaje es un segmento polimérico de anclaje y al menos uno de los segmentos poliméricos de estabilización estérica y de anclaje procede de uno o más monómeros etilénicamente insaturados que se han polimerizado por una técnica de polimerización en vivo. Se cree que el empleo de al menos uno de dichos segmentos poliméricos aumenta las propiedades de estabilización del estabilizador estérico.

Por ser un estabilizador "estérico" se entiende que la estabilización del material en forma de partículas a lo largo del vehículo líquido se produce como resultado de fuerzas de repulsión estéricas. Habiendo dicho esto, el estabilizador estérico puede presentar fuerzas de repulsión electrostáticas que también ayudan con la estabilización del material en forma de partículas. La función de estabilización estérica del estabilizador usado de acuerdo con la invención, por lo tanto, juega un papel importante al permitir que el material en forma de partículas se mantenga en un estado dispersado a lo largo de una serie diversa de vehículos líquidos, incluyendo fluidos corporales.

En un aspecto de la divulgación, el estabilizador usado comprende un grupo funcional ionizable que no forma parte de la parte de anclaje y presenta dentro del vehículo líquido una carga catiónica o aniónica. El estabilizador que comprende dicho grupo o grupos funcionales ionizables (por ejemplo, amina o ácido carboxílico) puede estar presente en una cantidad que varía de aproximadamente un 2 % en peso a aproximadamente un 50 % en peso, o de aproximadamente un 5 % en peso a aproximadamente un 40 % en peso con respecto al porcentaje en peso total del estabilizador usado. El uso de este tipo de estabilizador proporciona estabilización electrostérica. Se ha observado que la presencia de dicho estabilizador sorprendentemente aumenta la penetración del material en forma de partículas.

En una realización, el estabilizador comprende un segmento polimérico de estabilización estérica que tiene un grupo funcional ionizable terminal (es decir, en el extremo del segmento o cadena polimérica), de tal forma que se pueda proporcionar un catión (por ejemplo, amina) o un anión (ácido carboxílico). En una realización, el grupo funcional ionizable proporciona un catión.

En un aspecto adicional de la divulgación, el estabilizador comprende un segmento polimérico de estabilización estérica que tiene un grupo funcional terminal seleccionado entre una amina, un ácido carboxílico y un alcohol.

La cantidad de estabilizador usado con respecto al material en forma de partículas variará dependiendo de la naturaleza del material en forma de partículas, particularmente su tamaño. Por ejemplo, 1 g de material en forma de partículas de 5 nm requerirá más estabilizador que 1 g de material en forma de partículas de un micrómetro debido a

su mayor superficie específica. Los expertos en la materia podrán determinar la cantidad de estabilizador requerida para un material en forma de partículas dado.

5 En una realización, el estabilizador usado de acuerdo con la invención comprende una estructura polimérica. No hay una limitación particular sobre el peso molecular del estabilizador, y esta característica del estabilizador puede dictarse en parte sobre el modo por el que se va a administrar la dispersión a un sujeto. El estabilizador puede tener, por ejemplo, un peso molecular medio en número de hasta aproximadamente 160.000, o hasta aproximadamente 150.000, o hasta aproximadamente 100.000, o hasta aproximadamente 50.000.

10 En una realización, los estabilizadores usados de acuerdo con la presente invención tendrán un peso molecular medio en número relativamente bajo en comparación con los estabilizadores usados convencionalmente para estabilizar el material en forma de partículas.

15 En algunas realizaciones de la invención, puede ser preferible que el peso molecular medio en número del estabilizador sea menor de aproximadamente 30.000, o menor de aproximadamente 20.000, o menor de aproximadamente 10.000, o incluso menor de aproximadamente 5.000. El peso molecular medio en número del estabilizador también puede variar de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 3.000.

20 Se ha observado que los estabilizadores usados de acuerdo con la invención que tienen un peso molecular medio en número bastante bajo (por ejemplo, menor de aproximadamente 5.000, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 3.000) son particularmente eficaces para estabilizar un material en forma de partículas *in vivo*.

25 Los valores de peso molecular mencionados en el presente documento son valores de peso molecular medio en número (Mn). Si es apropiado, el peso molecular debe determinarse usando cromatografía de exclusión molecular (GPC). La GPC puede realizarse usando patrones de poliestireno para polímeros hidrófobos y patrones de óxido de polietileno para polímeros hidrófilos.

30 Los expertos en la materia apreciarán que la determinación del peso molecular para un copolímero en bloque puede requerir procedimientos adicionales. Por ejemplo, puede ser útil determinar el peso molecular del primer bloque antes de añadir el segundo bloque. Si un bloque tiene un peso molecular menor de aproximadamente 3.000, esto puede determinarse por espectroscopía de masas de tipo electrospray (EMS). En el caso de bloques de peso molecular superior, puede emplearse GPC usando patrones de poliestireno para bloques hidrófobos y patrones de óxido de polietileno para bloques hidrófilos.

35 La determinación del peso molecular de un copolímero de bloque global dependerá típicamente de la longitud de los dos bloques y de sus características de solubilidad. El peso molecular de los copolímeros de bloque de bajo peso molecular puede determinarse por EMS como se ha mencionado anteriormente. En el caso de copolímeros de bloque de mayor peso molecular para los que pueden encontrarse disolventes y patrones adecuados, puede usarse GPC. Por ejemplo, si los dos bloques son hidrófobos y solubles, por ejemplo, en tetrahidrofurano (THF), la GPC puede realizarse frente a patrones de poliestireno; si los dos bloques son hidrófilos y solubles, por ejemplo, en THF, puede ser útil usar patrones de óxido de polietileno en lugar de patrones de poliestireno. Sin embargo, es posible que los bloques de un copolímero de bloque sean demasiado distintos como para permitir un disolvente de disolución común; la poli-acrilamida-b-poliestireno es un ejemplo de dicho copolímero de bloque. En este caso, generalmente será necesario preparar y caracterizar el primer bloque y después desarrollar el segundo bloque y calcular el peso molecular del segundo bloque basándose en el grado de conversión de monómero en polímero.

50 Los estabilizadores usados de acuerdo con la invención ventajosamente pueden presentar propiedades de estabilización de alta eficacia, ya que la estabilización del material en forma de partículas puede conseguirse tanto a bajas como a altas concentraciones del material en forma de partículas dentro de un vehículo líquido. Los estabilizadores también pueden proporcionar dispersiones estables del material en forma de partículas a lo largo de una serie diversa de vehículos líquidos, tales como los que tienen una alta fuerza iónica (por ejemplo, solución de NaCl 0,15 M, e incluso tan alta como en una solución saturada de NaCl a temperatura ambiente), y también en un amplio intervalo de pH. Dichas propiedades hacen que las dispersiones sean particularmente adecuadas para aplicaciones *in vivo*.

60 Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que las propiedades de estabilización de alta eficacia que pueden proporcionarse por los estabilizadores son el resultado, al menos en parte, de estabilizadores que comprenden una parte de anclaje que está separada y es diferente de la parte de estabilización y ancla de forma segura el estabilizador al material en forma de partículas.

65 Por referencia al estabilizador que se "ancla" al material en forma de partículas, o en donde la parte de anclaje "ancla" el estabilizador al material en forma de partículas, se entiende que el estabilizador se une de forma segura al material en forma de partículas dentro de un vehículo líquido y puede permanecer unido de esta manera en ausencia de estabilizador libre en el vehículo líquido, donde el vehículo líquido tiene una alta fuerza iónica (por

ejemplo, solución saturada de cloruro sódico acuoso), y/o donde el vehículo líquido tiene una baja fuerza iónica (por ejemplo, agua pura).

5 En anclaje del estabilizador al material en forma de partículas puede conseguirse como resultado de que la parte de anclaje (1) se acopla covalentemente al material en forma de partículas y/o (2) se fija al material en forma de partículas a través de fuerzas electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno, carga iónica, fuerzas de Van der Waals o cualquier combinación de las mismas.

10 Como resultado de que los estabilizadores se anclan al material en forma de partículas, el material en forma de partículas puede mantenerse en un estado dispersado dentro del vehículo líquido a pesar de que esté presente a una baja o alta concentración y/o el vehículo líquido tenga una baja o alta fuerza iónica. Por consiguiente, una dispersión del material en forma de partículas en un vehículo líquido de acuerdo con la invención puede ser ventajosamente estable (es decir, no flocula) en condiciones en las que convencionalmente el material en forma de partículas estabilizado sería inestable (es decir, flocularía).

15 Los expertos en la materia apreciarán que los estabilizadores que no están unidos covalentemente al material en forma de partículas generalmente estabilizan y mantienen el material en forma de partículas en un estado dispersado al existir en un estado de equilibrio entre el estado adsorbido y desorbido del material en forma de partículas. Por consiguiente, cuando un estabilizador está presente a una concentración relativamente baja en un vehículo líquido dado, el equilibrio generalmente se desplaza a favor del estabilizador que se desorbe del material en forma de partículas, lo cual a su vez da como resultado la floculación del material en forma de partículas.

20 Cuando el anclaje se produce por el estabilizador que está acoplado covalentemente al material en forma de partículas, por supuesto puede no haber desorción del estabilizador. Cuando el anclaje se produce por otros medios, los estabilizadores usados de acuerdo con la presente invención, sin embargo, se unen de forma firme al material en forma de partículas y, por lo tanto, experimentan una desorción pequeña o nula del material en forma de partículas, aunque esté presente a baja concentración dentro del vehículo líquido. En otras palabras, cuando está presente a baja concentración dentro del vehículo líquido, el equilibrio de los estabilizadores adsorbidos usados de acuerdo con la invención está fuertemente a favor del estabilizador que se adsorbe en el material en forma de partículas, lo cual, a su vez, facilita que el material en forma de partículas se mantenga en un estado dispersado.

25 Puede realizarse un ensayo conveniente para confirmar la característica de anclaje de los estabilizadores usados de acuerdo con la invención, que a su vez puede reflejar su capacidad de mantener el material en forma de partículas en el estado dispersado requerido, diluyendo el material en forma de partículas estabilizado estérico a un 1 % de sólidos usando un vehículo líquido adecuado (típicamente agua), centrifugando esta solución de forma que los sólidos formen un tapón y después retirando el líquido sobrenadante para aislar el tapón sólido. El tapón sólido después se combina con un vehículo líquido adecuado (típicamente agua) sin añadir más estabilizador para formar de nuevo un 1 % de sólidos. Después se añade cloruro sódico a la solución resultante para producir un 10 % en peso de cloruro sódico. Si el material en forma de partículas puede redispersarse en esta solución final y permanecer dispersado durante al menos 1 hora, los estabilizadores estéricos se consideran anclados al material en forma de partículas.

30 Por "segmento polimérico de estabilización estérica" se entiende un segmento o región del estabilizador estérico que es polimérico (es decir, está formado por la polimerización de al menos un tipo de monómero) y que proporciona la función de estabilización estérica del estabilizador estérico. Por conveniencia, el segmento polimérico de estabilización estérica puede denominarse en lo sucesivo segmento polimérico "A".

35 Como se ha mencionado, el segmento polimérico de estabilización estérica funciona estabilizando el material en forma de partículas por todo el vehículo líquido al proporcionar fuerzas de repulsión estéricas.

40 Al ser polimérico, se apreciará que el segmento de estabilización estérica comprende restos de monómero polimerizados. De esta manera, el segmento comprenderá restos de monómero polimerizados que dan lugar a las propiedades de estabilización estérica requeridas. Los restos de monómero polimerizados que constituyen el segmento polimérico de estabilización estérica pueden ser iguales o diferentes.

45 El segmento polimérico de estabilización estérica puede sustituirse con un resto (por ejemplo, un sustituyente opcional como se define en el presente documento) o contener un resto de monómero polimerizado, que da lugar a propiedades de estabilización electrostática.

50 Para proporcionar el efecto de estabilización deseado, la parte de estabilización será soluble en al menos el vehículo líquido. La solubilidad de una parte de estabilización dada en un vehículo líquido dado puede determinarse fácilmente simplemente preparando la parte de estabilización en aislamiento y realizando un ensayo de solubilidad adecuado en el vehículo líquido elegido.

55 De forma similar, para proporcionar el efecto de estabilización estérica deseado, el segmento polimérico de estabilización estérica será soluble en al menos el vehículo líquido. La solubilidad de un segmento polimérico de

estabilización estérica dado en un vehículo líquido dado puede determinarse fácilmente simplemente preparando el segmento polimérico en aislamiento y realizando un ensayo de solubilidad adecuado en el vehículo líquido elegido.

5 El estabilizador en su conjunto puede ser soluble o no en el vehículo líquido dado, pero aun así presentará una parte de estabilización que es soluble.

10 Los expertos en la materia tendrán un conocimiento de materiales poliméricos que pueden emplearse como segmento polimérico de estabilización estérica, en cuanto a los monómeros que pueden polimerizarse para formar dichos polímeros. Por ejemplo, los materiales poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, poli(acrilamida), óxido de polietileno, polihidroxietilacrilato, poli N-isopropilacrilamida, polidimetilaminoetilmetacrilato, polivinil pirrolidona y copolímeros de los mismos. De esta manera, los monómeros adecuados que pueden usarse para formar el segmento polimérico de estabilización incluyen, pero sin limitación, acrilamida, óxido de etileno, hidroxietilacrilato, N-isopropilacrilamida, dimetilaminoetilmetacrilato, vinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

15 El segmento polimérico de estabilización estérica particular usado como parte del estabilizador estérico, por supuesto, dependerá de la naturaleza del vehículo líquido. Por ejemplo, si se usa un vehículo líquido acuoso, el segmento polimérico de estabilización estérica debe ser soluble en el medio acuoso. Los expertos en la materia podrán seleccionar un segmento polimérico de estabilización estérica apropiado para el vehículo líquido elegido.

20 Al poder seleccionar un segmento polimérico de estabilización estérica específico independiente de la parte de anclaje, los estabilizadores estéricos usados de acuerdo con la invención pueden diseñarse ventajosamente a medida para adecuarse a un vehículo líquido particular y, por lo tanto, maximizar las propiedades de estabilización del estabilizador estérico.

25 No hay una limitación particular en relación con la técnica de polimerización que puede usarse para preparar el segmento polimérico de estabilización estérica. Las técnicas de polimerización viva han resultado ser particularmente útiles a este respecto. Los expertos en la materia apreciarán que la "polimerización viva" es una forma de polimerización de adición de radicales por la que el crecimiento de la cadena se propaga sin prácticamente ninguna transferencia de cadena y prácticamente ninguna terminación que dé lugar a cadenas poliméricas muertas.
30 Por "cadena polimérica muerta" se entiende una que no puede someterse a una adición adicional de monómeros.

En una polimerización viva, típicamente todas las cadenas poliméricas se inician al principio de la polimerización iniciándose nuevas cadenas mínimas en etapas posteriores de la polimerización. Después de este proceso de
35 iniciación, todas las cadenas poliméricas en efecto crecen a la misma velocidad. Las características y propiedades de una polimerización viva generalmente incluyen (i) el peso molecular del polímero aumenta con la conversión, (ii) hay una distribución estrecha de longitudes de las cadenas poliméricas (es decir, son de peso molecular similar) y (iii) pueden añadirse monómeros adicionales a la cadena polimérica para crear estructuras de copolímero de bloque. De esta manera, la polimerización viva permite un control excelente sobre el peso molecular, la arquitectura de la cadena de polímero y la polidispersidad del polímero resultante, que no pueden conseguirse con métodos de
40 polimerización no vivos.

Las técnicas de polimerización viva adecuadas pueden seleccionarse entre polimerización iónica y polimerización por radicales libres controlada (CRP). Los ejemplos de CRP incluyen, pero sin limitación, polimerización iniferter, polimerización mediada por radicales libres estable (SFRP), polimerización por radicales con transferencia de
45 átomos (ATRP) y polimerización de transferencia de cadenas por adición-fragmentación reversible (RAFT).

El segmento polimérico de estabilización estérica puede formarse por la polimerización de un tipo de monómero o una combinación de dos o más monómeros diferentes. Por consiguiente, el segmento polimérico de estabilización estérica puede ser un segmento homopolimérico o un segmento copolimérico.

50 Dado que el segmento polimérico de estabilización forma solo parte del estabilizador estérico, en lugar de definir el segmento polimérico de estabilización estérica en términos de su peso molecular medio en número, puede ser útil hacer referencia al número de unidades monoméricas polimerizadas que colectivamente forman el segmento. De esta manera, aunque no hay una limitación particular sobre el número de dichas unidades que forman
55 colectivamente el segmento polimérico de estabilización estérica, en algunas realizaciones de la invención, puede ser deseable que el estabilizador estérico tenga un peso molecular medio en número relativamente bajo. En ese caso, es preferible que el segmento polimérico de estabilización estérica tenga menos de aproximadamente 100, más preferentemente menos de aproximadamente 50, y aún más preferentemente de aproximadamente 10 a
60 aproximadamente 30 unidades de resto de monómero polimerizadas que constituyen el segmento total.

Los estabilizadores estéricos usados de acuerdo con la invención también comprenden una parte de anclaje. La función de la parte de anclaje ya se ha mencionado. Siempre que el estabilizador pueda anclarse de manera adecuada al material en forma de partículas y sea diferente del estabilizador estérico, no hay una limitación particular en relación con la forma de la parte de anclaje.

65

La parte de anclaje estará acoplada de forma covalente al segmento de estabilización estérica. Por comodidad, la parte de anclaje puede representarse como "B". El segmento polimérico de estabilización estérica y la parte de anclaje pueden acoplarse covalentemente por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, el estabilizador estérico puede describirse como uno que es o que comprende la estructura A-C-B, donde A representa el segmento polimérico de estabilización estérica, B representa la parte de anclaje y C representa un resto de acoplamiento. Como alternativa, el segmento polimérico de estabilización estérica y la parte de anclaje pueden acoplarse directamente de forma covalente y, por lo tanto, el estabilizador puede describirse simplemente como uno que es o que comprende la estructura A-B. En este caso, A representa el segmento polimérico de estabilización estérica y B representa la parte de anclaje.

La parte de anclaje específica usada, generalmente vendrá dictada por la naturaleza del material en forma de partículas al que se va a anclar. Los expertos en la materia podrán seleccionar una parte de anclaje apropiada a unir con la superficie de un material en forma de partículas dado.

Cuando se selecciona el segmento de estabilización estérica y la parte de anclaje, puede ser deseable considerar las propiedades de estos componentes respectivos en el contexto de la aplicación de la dispersión deseada. Por ejemplo, uno o tanto el elemento de estabilización estérica como la parte de anclaje pueden seleccionarse de tal forma que sean biodegradables y/o biocompatibles.

La parte de anclaje puede estar presente como uno o más restos que forman un enlace covalente con el material en forma de partículas para acoplar covalentemente el estabilizador al material en forma de partículas. Por ejemplo, la parte de anclaje (en un estado anclado), puede proceder de un resto tiol (-SH) que acopla covalentemente el estabilizador al material en forma de partículas a través de un enlace -S-. En otras palabras, el estabilizador usado comprende un resto tiol, pero se acoplará de forma covalente a la partícula a través de un enlace -S-. Por consiguiente, la referencia a un estabilizador "usado" de acuerdo con la invención pretende ser una referencia a la forma del estabilizador antes de que se ancle al material en forma de partículas.

La parte de anclaje puede ser un segmento polimérico o, en otras palabras, un segmento polimérico de anclaje. De esta forma, el anclaje del estabilizador al material en forma de partículas generalmente no será por medio de un acoplamiento covalente, sino más bien por medio de fuerzas electrostáticas, formación de enlaces de hidrógeno, carga iónica, fuerzas de Van der Waals o cualquier combinación de los mismos.

Por "segmento polimérico de anclaje" se entiende un segmento o región de estabilizador estérico que es polimérica y que tiene afinidad por la superficie del material en forma de partículas y funciona anclando o uniendo el estabilizador estérico al material en forma de partículas. Por comodidad, el segmento polimérico de anclaje también puede representarse como "B".

Al ser polimérico, se apreciará que el segmento de anclaje comprende restos de monómeros polimerizados. El segmento comprenderá restos de monómeros polimerizados que dan lugar al anclaje requerido al material en forma de partículas. Los restos de monómero polimerizados que constituyen el segmento polimérico de anclaje pueden ser iguales o diferentes.

El segmento polimérico de anclaje puede presentar múltiples sitios para unir interacciones con el material en forma de partículas y se considera que esta propiedad permite que el estabilizador se ancle firmemente al material en forma de partículas a pesar de no estar covalentemente acoplado al mismo.

Generalmente, el segmento polimérico de anclaje tendrá al menos dos restos de monómero polimerizados que proporcionan, cada uno, un sitio para la unión con el material en forma de partículas, preferentemente al menos tres, más preferentemente al menos cinco, aún más preferentemente al menos siete y aún más preferentemente al menos diez de dichos restos de monómero polimerizados. No todos los restos de monómero polimerizados que constituyen el segmento polimérico de anclaje se requieren necesariamente para dar lugar a una interacción de unión con el material en forma de partículas, pero generalmente se prefiere que la mayoría, si no todos los restos de monómero polimerizados que constituyen el segmento polimérico de anclaje den lugar a una interacción de unión con el material en forma de partículas.

Por lo tanto, el segmento polimérico de anclaje puede describirse como un segmento que tiene múltiples sitios que colectivamente anclan el estabilizador al material en forma de partículas. Aunque un sitio de unión dado solo proporcione una interacción relativamente débil con el material en forma de partículas, la presencia de múltiples de estos sitios dentro del segmento le permite como un conjunto unirse de forma firme con el material en forma de partículas.

El segmento polimérico de anclaje también puede sustituirse con un resto (por ejemplo, un sustituyente opcional como se define en el presente documento) que puede dar lugar o no a una interacción de unión con el material en forma de partículas.

El segmento polimérico de anclaje específico usado generalmente se dictará por la naturaleza del material en forma de partículas al que se une.

5 Cuando se describe la interacción del segmento polimérico de anclaje con el material en forma de partículas, puede ser conveniente hacer referencia al carácter hidrófilo e hidrófobo del segmento y el material en forma de partículas. De esta manera, en general, se producirán interacciones de unión adecuadas cuando el segmento y el material en forma de partículas tengan un carácter hidrófilo o hidrófobo similar. Por ejemplo, cuando el material en forma de partículas tiene una superficie relativamente hidrófila (por ejemplo, su superficie puede humedecerse con agua), entonces debe conseguirse una buena unión usando el segmento polimérico de anclaje que tiene carácter hidrófilo (por ejemplo, en su forma aislada, el segmento sería soluble en un medio acuoso).

15 Dicho ejemplo podría darse cuando el material en forma de partículas es de un tipo que puede formar una carga en su superficie. En este caso, puede ser deseable que el segmento comprenda restos polimerizados de monómeros que también pueden formar una carga (por ejemplo, restos de un monómero ionizable) para promover la unión iónica entre el segmento y el material en forma de partículas. La promoción de la formación de dichas especies cargadas podría facilitarse ajustando el pH del vehículo líquido en el que residen el estabilizador y el material en forma de partículas.

20 Por la expresión "monómero ionizable" se entiende que el monómero comprende un grupo funcional que puede ionizarse en solución para formar un grupo catiónico o aniónico. Dichos grupos funcionales generalmente serán capaces de ionizarse en condiciones ácidas o básicas mediante la pérdida o aceptación de un protón. En general, los grupos funcionales son grupos ácidos o grupos básicos (es decir, grupos que pueden donar o aceptar un átomo de H, respectivamente). Por ejemplo, un grupo funcional de ácido carboxílico puede formar un anión carboxilato en condiciones básicas, y un grupo funcional amina puede formar un catión de amonio cuaternario en condiciones ácidas. Los grupos funcionales también pueden ser capaces de ionizarse a través de un proceso de intercambio de iones.

30 Los ejemplos de monómeros ionizables adecuados que tienen grupos ácidos incluyen, pero sin limitación, ácido metacrílico, ácido acrílico, ácido itacónico, ácidos p-estireno carboxílicos, ácidos p-estireno sulfónicos, ácido vinil sulfónico, ácido vinil fosfórico, monoacriloxietil fosfato, 2-(metacrililoxi)etil fosfato, ácido etacrílico, ácido alfa-cloroacrílico, ácido crotónico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido mesacónico y ácido maleico. Los ejemplos de monómeros ionizables adecuados que tienen grupos básicos incluyen, pero sin limitación, 2-(dimetilamino)etil y propil acrilatos y metacrilatos, y los 3-(dietilamino)etil y propil acrilatos y metacrilatos correspondientes.

35 Los expertos en la materia podrán seleccionar un segmento polimérico de anclaje apropiado para unir con la superficie de un material en forma de partículas dado.

40 Al poder seleccionar un segmento polimérico de anclaje específico independiente del segmento polimérico de estabilización estérica, los estabilizadores estéricos usados de acuerdo con la invención pueden diseñarse ventajosamente a medida para adecuarse a un material en forma de partículas particular y de esta manera maximizar las propiedades de anclaje del estabilizador estérico. Por ejemplo, puede ser deseable que el segmento polimérico de anclaje comprenda grupos funcionales de ácido carboxílico, fosfinato, fosfonato y/o fosfato. Cuando el material en forma de partículas al que se une el segmento de anclaje comprende hierro (por ejemplo, material en forma de partículas de óxido de hierro magnético), puede ser deseable que el segmento comprenda grupos funcionales fosfinato, fosfonato y/o fosfato. Dichos segmentos generalmente se formarán usando monómeros que comprenden los grupos funcionales de fósforo.

50 Los expertos en la materia apreciarán la diversidad de materiales poliméricos que pueden emplearse como segmento polimérico de anclaje, en cuanto a los monómeros que pueden polimerizarse para formar dichos polímeros. Por ejemplo, los materiales poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliestireno, ácido poliitacónico, ácidos poli-p-estireno carboxílicos, ácidos poli-p-estireno sulfónicos, ácido polivinil sulfónico, ácido polivinil fosfónico, poli-monoacriloxietil fosfato, poli-2-(metilacrililoxi) etil fosfato, ácido polietacrílico, ácido poli-alfa-cloroacrílico, ácido poli-crotónico, ácido polifumárico, ácido policitracónico, ácido polimesacónico, ácido polimaleico, poli-2-(dimetil amino) etil y propil acrilatos y metacrilatos, los poli-3-(dietilamino) etil y propil acrilatos y metacrilatos correspondientes, polímeros de acrilato y metacrilato hidrófobos, polidimetilaminoetilmecacrilato y copolímeros de los mismos. De esta manera, los monómeros adecuados que pueden usarse para formar el segmento polimérico de anclaje incluyen, pero sin limitación, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido itacónico, ácidos p-estireno carboxílicos, ácidos p-estireno sulfónicos, ácido vinil sulfónico, ácido vinil fosfónico, monoacriloxietilfosfato, 2-(metilacrililoxi) etil fosfato, ácido etacrílico, ácido alfa-cloro-acrílico, ácido crotónico, ácido fumárico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido maleico, 2-(dimetilamino) etil y propil acrilatos y metacrilatos, los 3-(dietilamino) etil y propil acrilatos y metacrilatos correspondientes, estireno, monómeros de acrilato y metacrilato hidrófobos, dimetilaminoetilmecacrilato y combinaciones de los mismos.

65 Las técnicas de polimerización viva tales como las descritas en el presente documento han resultado ser particularmente útiles para preparar el segmento polimérico de anclaje.

Cuando la parte de anclaje es un segmento polimérico de anclaje, al menos uno de los segmentos poliméricos de estabilización estérica y anclaje puede proceder de uno o más monómeros etilénicamente insaturados que se han polimerizado por una técnica de polimerización viva. Cuando solo uno de los segmentos se obtiene de esta manera, será preferible el segmento polimérico de anclaje.

5 El segmento polimérico de anclaje puede formarse por la polimerización de un tipo de monómero o una combinación de dos o más monómeros diferentes. Por consiguiente, el segmento polimérico de anclaje puede ser un segmento homopolimérico o un segmento copolimérico.

10 Dado que el segmento polimérico de anclaje puede formar solo parte del estabilizador estérico, en lugar de definir el segmento polimérico de anclaje en términos de su peso molecular medio en número, en su lugar puede ser útil hacer referencia al número de unidades monoméricas polimerizadas que colectivamente forman el segmento. De esta manera, aunque no hay una limitación particular sobre el número de dichas unidades que colectivamente forman el segmento polimérico de anclaje, en algunas realizaciones de la invención puede ser deseable que el
15 estabilizador estérico tenga un peso molecular medio en número relativamente bajo. En este caso, es preferible que el segmento polimérico de anclaje tenga menos de aproximadamente 100, más preferentemente menos de aproximadamente 40, aún más preferentemente menos de aproximadamente 30, incluso más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 25, y aún más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 unidades de restos de monómeros polimerizadas que constituyen el segmento global.

20 Cuando se selecciona el segmento polimérico de estabilización estérica y anclaje, o los monómeros que pueden usarse para prepararlos, puede ser deseable considerar las propiedades de los segmentos poliméricos respectivos en el contexto de la aplicación deseada de la dispersión. Por ejemplo, pueden seleccionarse uno o los dos segmentos poliméricos de tal forma que sean biodegradables y/o biocompatibles.

25 Siempre que las funciones del estabilizador sean como se describen en el presente documento, no hay ninguna limitación particular sobre cómo deben disponerse espacialmente el segmento polimérico de estabilización y el segmento polimérico de anclaje.

30 El segmento polimérico de estabilización estérica y el segmento polimérico de anclaje pueden acoplarse entre sí por cualquier medio adecuado para formar el estabilizador estérico usado de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el estabilizador estérico puede describirse como uno que es o que comprende la estructura A-C-B, donde A representa el segmento polimérico de estabilización estérica, B representa el segmento polimérico de anclaje y C representa un resto de acoplamiento. Como alternativa, el segmento polimérico de estabilización estérica y el segmento polimérico
35 de anclaje pueden acoplarse directamente entre sí a través de un enlace covalente y, por lo tanto, el estabilizador puede describirse simplemente como un estabilizador que es o que comprende un copolímero de bloque A-B. En este caso, A representa el segmento polimérico de estabilización estérica y B representa el segmento polimérico de anclaje.

40 Por la descripción anterior se apreciará que cada uno de A y B pueden ser independientemente un homopolímero o un copolímero (por ejemplo, aleatorio, de bloque, gradual, etc.). El estabilizador puede comprender más de un segmento polimérico de estabilización estérica (A) y más de un segmento polimérico de anclaje (B). Por ejemplo, el estabilizador puede describirse como que es o comprende un copolímero de bloque A-B-A. En este caso, cada A representa el segmento polimérico de estabilización estérica, que puede ser igual o diferente, y B representa el
45 segmento polimérico de anclaje. El estabilizador también podría describirse como uno que es o que comprende un copolímero de bloque B-A-B, donde cada B representa el segmento polimérico de anclaje, que puede ser igual o diferente, y A representa el segmento polimérico de estabilización estérica que tiene una longitud de cadena suficiente tal que forma un "bucle" que se extiende al interior de vehículo líquido y realiza su papel de estabilización.

50 El estabilizador también puede tener estructuras más complejas tales como estructuras de polímero en estrella y peine. En ese caso, el segmento polimérico de anclaje B podría representar el esqueleto polimérico principal de dichas estructuras, uniéndose al mismo múltiples segmentos poliméricos de estabilización A.

55 La interacción de un estabilizador estérico usado de acuerdo con la invención (en forma de una estructura de copolímero de bloque A-B) con el material en forma de partículas en el vehículo líquido podría ilustrarse en el esquema no simplificado a escala mostrado en la Figura 13.

Haciendo referencia a la Figura 13, el estabilizador estérico representado por un copolímero de bloque A-B presenta una afinidad hacia la superficie del material en forma de partículas (P) a través del segmento polimérico de anclaje
60 (B). El segmento polimérico de anclaje (B), por lo tanto, fija el estabilizador estérico al material en forma de partículas. El segmento polimérico de anclaje (B) proporciona múltiples sitios para unir sitios para interacciones de unión entre el segmento y el material en forma de partículas. El segmento polimérico de estabilización estérica (A), que es diferente del segmento (B), es soluble en el vehículo líquido y funciona manteniendo el material en forma de partículas dispersado a lo largo de todo el vehículo líquido. Se apreciará que, en la práctica, la superficie del material en forma de partículas tendrá muchos estabilizadores estéricos fijados al mismo y que estos se han omitido de la
65 ilustración de la Figura 13 por claridad.

En la Figura 14 se muestra una ilustración similar a la de la Figura 13 en la que el estabilizador estérico usado de acuerdo con la invención está en forma de un copolímero de bloque A-B-A.

5 Al menos uno de los segmentos poliméricos de estabilización estérica y anclaje pueden proceder de uno o más monómeros etilénicamente insaturados que se han polimerizado por una técnica de polimerización viva tal como polimerización iónica, polimerización iniferter, polimerización SFRP, ATRP y RAFT. De estas técnicas de polimerización viva, se prefiere la polimerización RAFT.

10 El estabilizador usado de acuerdo con la invención puede prepararse y después usarse para estabilizar el material en forma de partículas. Como alternativa, un resto puede anclarse al material en forma de partículas y ese resto usarse para facilitar la polimerización del monómero de forma que crezca el estabilizador hacia el exterior del material en forma de partículas.

15 Los expertos en la materia apreciarán que el estabilizador seleccionado para su uso de acuerdo con la invención puede depender de la naturaleza del material en forma de partículas que se estabiliza y la forma en la que se administra a un sujeto. Por ejemplo, si el material en forma de partículas se va a administrar por vía intravenosa y es necesario que se mantenga en circulación durante algún tiempo, puede ser necesario que el estabilizador sea un estabilizador estérico como se describe en el presente documento.

20 Si el material en forma de partículas se va a administrar por vía oral y necesita permanecer estable en las condiciones de elevada acidez del estómago, también puede ser necesario que el estabilizador sea un estabilizador estérico como se describe en el presente documento, por ejemplo, un estabilizador estérico que comprende poliacrilamida.

25 Por el material en forma de partículas que se “dispersa por todo” un vehículo líquido se entiende que el material en forma de partículas se presenta como una fase dispersa por todo el vehículo líquido que, por sí mismo, con respecto al material en forma de partículas, se presenta como una fase o medio líquido continuo. En otras palabras, la composición podría describirse como una composición que comprende una suspensión o dispersión del material en forma de partículas por todo el vehículo líquido.

30 Como se usa en el presente documento, el término “líquido” en el contexto del vehículo líquido pretende hacer referencia a un vehículo en el que el material en forma de partículas se dispersa completamente y que está en un estado líquido al menos a la temperatura de uso deseada en los métodos de la invención. Típicamente, un vehículo líquido se considerará en un estado “líquido” si, en ausencia de un estabilizador, el material en forma de partículas dispersado por todo el vehículo puede flocular o sedimentar en el vehículo para formar un sedimento. En otras palabras, si el material en forma de partículas puede moverse de una forma relativamente libre en el vehículo, entonces se considera “líquido”.

40 El vehículo líquido puede estar hecho de uno o más líquidos diferentes. Se describen vehículos líquidos farmacológicamente aceptables adecuados en Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, (1990). En general, el vehículo líquido será un vehículo líquido acuoso. Las soluciones acuosas o salinas solubles y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol preferentemente se emplean como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables.

45 La dispersión puede comprender uno o más aditivos farmacológicamente aceptables conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el vehículo líquido puede comprender uno o más aditivos tales como agentes humectantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, tampones, electrolitos y conservantes.

50 La naturaleza particular del vehículo líquido y cualquier aditivo presente en el mismo (si está presente), dependerá en parte de la aplicación deseada de la composición. Los expertos en la materia podrán seleccionar un vehículo líquido y aditivo (si está presente) adecuado para la aplicación deseada de la dispersión.

55 También debe entenderse que el material en forma de partículas y/o el estabilizador (estérico) también pueden acoplarse a un ligando para efectuar una dirección más específica a un tumor. Esto no será aplicable necesariamente en todas las situaciones, pero en la medida en que exista una molécula diana apropiada para un tumor dado, esto puede proporcionar una especificidad adicional útil.

Aunque la noción general de la terapia dirigida no es nueva, hasta la fecha el éxito de la terapia dirigida ha estado limitado debido al cumplimiento de los criterios que se han requerido de una molécula diana potencial, siendo estos:

- 60
- (i) localización en la superficie celular
 - (ii) alta densidad de la molécula en la superficie celular
 - (iii) ausencia de internalización de la molécula; y
 - (iv) ausencia de un desprendimiento de antígeno apreciable desde la superficie celular.
- 65

Existen limitaciones en términos de la identificación de dichas moléculas, en particular antígenos que también son idealmente específicos de tumor. Sin embargo, en la medida en que dichas dianas se conocen para una situación dada, pueden explotarse de forma útil.

5 Para este fin, la referencia a un "ligando" debe entenderse como una referencia a cualquier molécula que tiene especificidad (no necesariamente especificidad exclusiva, aunque esto es preferible) y afinidad de unión por una molécula de tumor. Los ejemplos de ligandos incluyen moléculas inmunointeractivas, agentes peptidomiméticos, metales lantánidos (que interactúan con especies de ARN), sustratos enzimáticos (que interactúan con enzimas relacionadas con la muerte celular) y putrescina (que interactúa con transglutaminasa de tejidos). En una
10 realización, el ligando es una molécula inmunointeractiva. Aunque una molécula inmunointeractiva preferida es una molécula de inmunoglobulina, la presente invención se extiende a otras moléculas inmunointeractivas tales como fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos desinmunizados incluyendo anticuerpos humanizados y moléculas de unión a antígeno asociadas con células T (TABM). Más preferentemente, la molécula inmunointeractiva es un anticuerpo tal como un anticuerpo policlonal o monoclonal. Debe entenderse que el ligando
15 objeto puede enlazarse, unirse o asociarse de otra manera a cualquier otra molécula proteica o no proteica o célula.

El ligando se "dirige a" la molécula tumoral. Debe entenderse que el ligando puede no exhibir necesariamente una exclusividad completa, aunque es preferible. Por ejemplo, se sabe que los anticuerpos algunas veces presentan reacción cruzada con otros antígenos. Un determinante o epítipo antigénico incluye la parte de la molécula a la que
20 puede dirigirse una respuesta inmunitaria. El determinante antigénico o epítipo puede ser un epítipo de células B o, cuando sea apropiado, una molécula de unión a un receptor de células T.

La presente invención también puede diseñarse de tal forma que un ligando se dirija a una o más moléculas tumorales. Por consiguiente, la presente invención puede diseñarse para administrar dos o más ligandos dirigidos a
25 diferentes dianas, por ejemplo, como medio para aumentar la dosis de toxina celular que se libera a una población de células neoplásicas. También proporciona un medio conveniente para liberar simultáneamente dos toxinas diferentes.

Cuando se usa, el ligando puede estar unido directamente al material en forma de partículas o puede estar unido indirectamente al material en forma de partículas formando parte del estabilizador estérico. Por ejemplo, el ligando
30 puede estar unido al estabilizador estérico.

Los expertos en la materia apreciarán que el material en forma de partículas dispersado usado de acuerdo con la invención presentará un diámetro hidrodinámico dentro del vehículo líquido. El diámetro hidrodinámico es la
35 distancia o tamaño que deriva del material en forma de partículas *per se* y los estabilizadores estéricos asociados con el material en forma de partículas. Esto puede explicarse más claramente haciendo referencia a la Figura 15 en la que el material en forma de partículas *per se* (10) está dispersado dentro de un vehículo líquido (no mostrado) por estabilizadores (estéricos) (20). Por lo tanto, puede verse que el diámetro hidrodinámico (30) del material en forma de partículas dispersado representa el diámetro producido por una combinación del material en forma de partículas y
40 los estabilizadores (estéricos). Cuando el material en forma de partículas dispersado no tiene una forma simétrica, el diámetro hidrodinámico se considerará el mayor diámetro hidrodinámico presentado por el material en forma de partículas dispersado.

Sin deseo de limitarse por ninguna teoría, se cree que el diámetro hidrodinámico del material en forma de partículas dispersado también puede jugar un papel para facilitar la penetración profunda del material en forma de partículas dentro de tumores.
45

En una realización, el diámetro hidrodinámico del material en forma de partículas dispersado es menor de aproximadamente 500 nm, es menor de aproximadamente 350 nm, menor de aproximadamente 250 nm, menor de
50 aproximadamente 100 nm, menor de aproximadamente 50 nm, menor de aproximadamente 25 nm o menor de aproximadamente 15 nm.

En una realización adicional, el diámetro hidrodinámico del material en forma de partículas dispersado es aproximadamente: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210,
55 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 nm.

Para evitar cualquier duda, la referencia en el presente documento al "diámetro hidrodinámico" del material en forma de partículas dispersado pretende indicar un diámetro medio (al menos aproximadamente un 50 % en número) del material en forma de partículas dispersado. El diámetro hidrodinámico del material en forma de partículas dispersado se determina en el presente documento por cromatografía hidrodinámica (HDC, PL-PSDA (Polymer Laboratories)).
60

Debe entenderse que la referencia en el presente documento a un "sujeto" incluye seres humanos, primates, animales de granja (por ejemplo, ovejas, cerdos, vacas, caballos, burros), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos) y animales salvajes cautivos (por ejemplo, zorros, canguros, ciervos). Preferentemente, el mamífero es un ser humano.
65

Debe entenderse que el término “tratamiento” no implica necesariamente que el sujeto se trata hasta la recuperación total. Por consiguiente, el tratamiento incluye la reducción de la gravedad de una afección existente, la mejora de los síntomas de una afección particular o la prevención o reducción de otra manera del riesgo de desarrollar una afección particular.

5 Una “cantidad eficaz” significa una cantidad necesaria al menos parcialmente para conseguir la respuesta deseada, o para retrasar el inicio o inhibir el progreso o detener totalmente, el inicio o progreso de una afección particular a tratar. La cantidad varía dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar, el grado de protección deseado, la formulación de la composición, la evaluación de la situación
10 médica y otros factores relevantes. Es de esperar que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios.

En un aspecto relacionado de la presente invención, el sujeto que se somete a tratamiento puede ser cualquier ser humano o animal que necesite tratamiento terapéutico. A este respecto, la referencia en el presente documento al
15 “tratamiento” debe considerarse en su contexto más amplio. El término “tratamiento” no implica necesariamente que un mamífero se trate hasta la recuperación total. Por consiguiente, el tratamiento incluye la mejora de los síntomas de una afección particular o la prevención o reducción de otra manera del riesgo de desarrollar una afección particular. El “tratamiento” también puede reducir la gravedad de una afección existente.

20 La administración del material en forma de partículas y la toxina celular, en forma de composiciones farmacéuticas, puede realizarse por cualquier medio conveniente. Se contempla que la composición farmacéutica presenta actividad terapéutica cuando se administra en una cantidad que depende del caso particular. La variación depende, por ejemplo, del ser humano o animal y el agente particular, material en forma de partículas y toxina seleccionada para el uso. Puede ser aplicable un amplio intervalo de dosis. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para
25 proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, la vía respiratoria, intratraqueal, nasofaríngea, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intradérmica, intramuscular, intraocular, intratecal, intracerebral, intranasal, infusión, oral, rectal mediante un parche de goteo IV e implante. La partícula también puede administrarse
30 directamente al tumor.

Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden material en forma de partículas farmacológicamente aceptable dispersado a través de un vehículo líquido farmacológicamente aceptable. Por “farmacológicamente aceptable” se entiende que el material en forma de partículas, vehículo líquido u otro constituyente de la
35 composición (por ejemplo, el estabilizador estérico) es adecuado para la administración a un sujeto por sí mismo. En otras palabras, la administración del material en forma de partículas, vehículo líquido u otro constituyente de la composición a un sujeto no dará como resultado una toxicidad inaceptable, incluyendo respuestas alérgicas y patologías.

40 Solo como guía, un experto en la materia puede considerar “farmacológicamente aceptable” una entidad aprobada por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o indicada la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Habiendo dicho esto, los expertos en la materia apreciarán que la idoneidad de una composición para administración
45 a un sujeto y si un material en forma de partículas o vehículo líquido dado se consideraría farmacológicamente aceptable o no, dependerá en alguna medida del modo de administración seleccionado. De esta forma, puede ser necesario considerar el modo de administración cuando se evalúa si una composición dada es adecuada para la administración a un sujeto o es farmacológicamente aceptable.

50 Las formas farmacéuticas preferentemente son adecuadas para su uso inyectable e incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben estar conservadas frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua,
55 etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos pueden producirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse mediante el uso en las
60 composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos

esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son, secado al vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución filtrada de forma estéril
5 previamente del mismo.

De acuerdo con la invención, el material en forma de partículas estabilizado y la toxina celular se formulan en dos formulaciones distintas.

10 La presente invención se describe adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

15 Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀.

Parte (a): preparación de ferrofluido acuoso diluido estable en medio ácido.

20 Se produjeron nanopartículas de magnetita siguiendo el método de Massart (Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE Transactions on Magnetics, 1981. MAG-17(2): p. 1247-1248). En una reacción típica, se mezclaron 80 ml de FeCl₃.6H₂O 1 M en HCl 2 M y 40 ml de FeCl₂.4H₂O 1 M en HCl 2 M en un vaso de precipitados de 2 litros y la mezcla se diluyó a 1,2 litros con agua MQ. Después se añadieron rápidamente 250 ml de NH₄ OH (28 % (p/p)) al vaso de precipitados y la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos. Después de añadir NH₄OH, el color de la mezcla se volvió inmediatamente de naranja a negro, sugiriendo la
25 formación de magnetita. La magnetita después se oxidó en medio ácido a maghemita por calentamiento a 90 °C con nitrato de hierro durante aproximadamente una hora. El color de la suspensión cambió de negro a pardo rojizo. Las partículas de maghemita después se decantaron magnéticamente, se lavaron con acetona y finalmente se peptizaron en agua produciendo una dispersión estable (5 % en peso). El pH de la dispersión fue de aproximadamente 1,5-2.

30 Parte (b): preparación de un agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ usando: ácido 2-[[dodecilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]succínico.

35 Se preparó una solución de ácido 2-[[dodecilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]succínico (0,81 g, 2,0 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-ciano-valérico) (0,09 g, 0,3 mmol), acrilamida (2,87 g, 40,3 mmol) en dioxano (15 g) y agua (15 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se calentó a 70 °C durante 4 h. Al final de este período, se añadieron monoacriloxietil fosfato (3,98 g, 20 mmol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianovalérico) (0,09 g, 0,3 mmol) al matraz. La mezcla se desoxigenó y el calentamiento se continuó a 80 °C durante 12 horas más. La solución de copolímero tenía un 23,6 % de sólidos. La
40 solución de copolímero después se diluyó con agua MQ al 0,7 % en peso y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M.

Parte (c): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1, parte (a) y el agente macro RAFT del ejemplo 1, parte (b).

45 Se diluyó la dispersión de nanopartículas preparada en el ejemplo 1 parte (a) (27 g) con agua MQ (200 g) para producir una dispersión del 2 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas después se elevó a 5 usando hidróxido sódico 0,1 M. La dispersión al 2 % en peso de la dispersión de óxido de hierro después se añadió a la solución de copolímero macro RAFT del ejemplo 1, parte (b) (100 g). La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador de hélice durante 45 minutos antes de ajustar el pH a pH 7 usando solución de
50 hidróxido sódico. La mezcla después se dejó agitar vigorosamente durante otras 2 horas a temperatura ambiente. La dispersión de nanopartículas después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. Las partículas más grandes de la dispersión se retiraron por ultracentrifugación. La dispersión de nanopartículas purificada después se destiló para aumentar la carga de sólidos en la dispersión de ferrofluido acuoso hasta aproximadamente un 70 % en peso. Se descubrió que
55 el ferrofluido acuoso resultante era estable en solución de nitrato amónico al 60 %.

Ejemplo 2

60 Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa usando un 95 % de reactivo macro RAFT de poli(monoacriloxietilfosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ y reactivo macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅ al 5%

Parte (a): esterificación de poli(etilenglicol)monometil éter con ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico

65 Se calentó metoxiPEG (Mn ~798) y se agitó hasta que se licuó y homogeneizó, y después se introdujeron 19,95 g (25,0 mmol) pesados en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 250 ml, y después se dejó solidificar. Se

añadieron ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico (6,96 g, 29,3 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (360 mg, 2,9 mmol) al matraz, se introdujo una barra de agitación magnética y el matraz se purgó con nitrógeno. Se añadió diclorometano seco (75 ml) y la mezcla se agitó hasta que todos los sólidos se disolvieron. El matraz después se enfrió en un baño de hielo y posteriormente se añadió una solución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (6,03 g, 29,3 mmol) diclorometano seco (25 ml) gota a gota durante 1 h. La reacción se agitó en el baño de hielo durante 10 min más y después a temperatura ambiente durante 24 h. La suspensión amarilla resultante se diluyó con 1:1 hexano-éter (100 ml) y se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado. El residuo del filtro se lavó con más partes pequeñas de 1:1 hexano-éter hasta que adquirió un color blanco y los filtrados combinados se evaporaron para dar un aceite naranja sin brillo, turbio y granuloso. El producto bruto se disolvió en diclorometano (75 ml) y se agitó con ácido oxálico sólido (4 g) durante 1 h, después se diluyó con hexano (70 ml) y se dejó sedimentar, produciendo un precipitado blanco floculento. La mezcla se filtró y se evaporó, y el aceite bruto se disolvió en 2:1 hexano-diclorometano (150 ml) y se pasó a través de un tapón de alúmina (40 g). La elución con 2:1 hexano-diclorometano adicional se continuó hasta que el eluato fue incoloro. Los eluatos combinados se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron para dar un aceite naranja pálido transparente, 24,69 g, 97 %.

Parte (b): preparación de un reactivo macro RAFT de poli(óxido de etileno)17-bloque-poli(monoacriloxietil fosfato)10 basado en el macro RAFT del ejemplo 2 parte (a).

Se preparó una solución de RAFT-PEO del ejemplo 2 parte (a) (3,60 g, 3,5 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico) (0,20 g, 0,7 mmol), monoacriloxietil fosfato (6,89 g, 35 mmol) en dioxano (45 g) y agua (22,5 g) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos y la reacción se realizó a 70 °C durante 12 horas. La solución de copolímero tenía un 15,1 % de sólidos. La solución de copolímero después se diluyó con agua MQ al 0,7 % en peso y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M.

Parte (c): preparación de un agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)10-bloque-poli(acrilamida)20 usando ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico.

Se preparó una solución de ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico (3,2 g, 13,6 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico) (0,19 g, 0,7 mmol), acrilamida (19,27 g, 271,1 mmol) en dioxano (45 g) y agua (22,5 g) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se puso a 70 °C durante 4 h. La solución de homopolímero tenía un 32,0 % de sólidos. Se añadieron 15 g de la solución de homopolímero obtenida, monoacriloxietil fosfato (4,50 g, 22,9 mmol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico) (0,04 g, 0,2 mmol) a un matraz de fondo redondo de 100 ml. La mezcla se desoxigenó por purga con nitrógeno durante 15 minutos y el matraz se agitó en un baño de aceite a 70 °C durante 12 horas. La solución de copolímero, que contenía un 40,4 % en sólidos, después se diluyó con agua MQ al 1,2 % en peso. El pH de la solución de copolímero diluida se ajustó a 5 con NaOH 0,1 M.

Parte (d): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) y una mezcla 95:5 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c).

Una dispersión de nanopartículas preparada de acuerdo con el ejemplo 1, parte (a) se diluyó con agua MQ para producir una dispersión en peso de las nanopartículas al 2 %. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Una mezcla de macro RAFT que consistía en 50 g de una solución al 0,7 % en peso del ejemplo 2 parte (b) y 50 g de solución al 1,2 % en peso del ejemplo 2 parte (c) se mezclaron entre sí y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M. Después se añadió a la mezcla de macro RAFT la dispersión al 2 % en peso de óxido de hierro mantenida al mismo pH. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a pH 7,0. Después, la mezcla se dejó agitar durante otras 3 horas. A este pH, el copolímero permaneció parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. Las partículas más grandes de la dispersión se retiraron por ultracentrifugación. La dispersión de nanopartículas purificada después se destiló para aumentar la carga de sólidos en la dispersión de ferrofluido acuoso a aproximadamente un 70 % en peso. Se observó que el ferrofluido acuoso resultante era estable en solución salina tamponada con fosfato.

Parte (e): modificación de estabilizadores para partículas de óxido de hierro del ejemplo 2 parte (d)

En nanopartículas recubiertas preparadas en el ejemplo 2 parte (d) (7,8 g), se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 14,4 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 20 mg), se mezcló por agitación y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadió una solución de diamina (90 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) en 1 ml de agua) a la mezcla de reacción y se dejó reaccionar durante 3,5 horas más. La solución después se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de la reacción.

Ejemplo 3

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa usando el ferrofluido del ejemplo 1 parte (a) y el agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ del ejemplo 2 parte (b)

La dispersión de nanopartículas (8,0 g) preparada de acuerdo con el ejemplo 1 parte (a) se diluyó con 50 g de agua MQ para producir una dispersión del 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Después se añadió la dispersión al 0,5 % en peso de óxido de hierro mantenida al mismo pH a los 50 g del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b). La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a pH 7,0. Después, la mezcla se dejó en agitación durante otras 3 horas. A este pH, el copolímero se mantuvo parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos finales de la dispersión fue del 0,74 %.

Ejemplo 4

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) usando el reactivo macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ del ejemplo 2 parte (c)

Se diluyó la dispersión de nanopartículas preparada en el ejemplo 1 parte (a) (6,19 g) con agua MQ (100 g) para producir una dispersión de las nanopartículas al 1 % en peso. El pH de esta dispersión de nanopartículas después se elevó luego a 5 usando hidróxido sódico 0,1 M. La dispersión al 2 % en peso de óxido de hierro después se añadió a la solución de copolímero macro RAFT del ejemplo 2 parte (c) (50 g). La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador de hélice 2 horas antes de ajustar el pH a pH 7 usando solución de hidróxido sódico. La mezcla después se dejó agitar vigorosamente durante otras 12 horas a temperatura ambiente. La dispersión de nanopartículas después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión final es del 0,71 %.

Ejemplo 5

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) usando poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina al 100 %

Parte (a): preparación de agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀ bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina a partir del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c)

Se añadieron N-hidroxi succinimida al 98 % (0,64 g) y 2,2'-(etilenodioxi)bis(etilamina) al 98 % (0,54 g) a 30,0 g de copolímero de bloque de poli(monoacriloxietilfosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ del ejemplo 2 parte (c) a pH 6,25 en un frasco de vidrio de 100 ml. El frasco se cerró herméticamente con parafilm y se puso en un rodillo para la mezcla durante 2 horas. Después de 2 horas, la mezcla tenía un pH de 8,12 para producir los grupos carboxilo activados con NHS que son reactivos con la amina primaria. Después se añadieron 1,26 g de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida a la mezcla, que se dejó en el rodillo durante 12 horas más. El exceso de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida se retiró por diálisis.

Parte (b): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1, parte (a) y el agente macro RAFT del ejemplo 5, parte (a)

La dispersión de nanopartículas preparada en el ejemplo 1 parte (a) (8,38 g) se diluyó con agua MQ (50 g) para producir una dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas después se elevó a 5 usando hidróxido sódico 0,1 M. La dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas de óxido de hierro después se añadió a la solución de copolímero macro RAFT del ejemplo 5 parte (a) (22,6 g) y 50 g de agua MQ. La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador de hélice durante 2 horas antes de ajustar el pH a pH 7 usando solución de hidróxido sódico. La mezcla después se dejó agitar vigorosamente durante otras 10 horas a temperatura ambiente. La dispersión de nanopartículas después se dializó para retirar las sales, los disolventes residuales, los productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y el polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializada fue del 0,36 %.

Ejemplo 6

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietilfosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ al 95 % del ejemplo 2 parte (c) y poli(monoacriloxietilfosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina al 5 % del ejemplo 5 parte (a)

La dispersión de nanopartículas preparada en el ejemplo 1 parte (a) (8,09 g) se diluyó con agua MQ (50 g) para producir una dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas después se elevó a 5 usando hidróxido sódico 0,1 M. La dispersión al 0,5 % en peso de la dispersión de óxido de hierro después se añadió a la solución de copolímero macro RAFT que tenía el pH 5,0 del ejemplo 5 parte (a) (1,7 g), ejemplo 2 parte (c) (1,0 g) y 50 g de agua MQ. La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador de hélice durante 2 horas antes de ajustar el pH a pH 7 usando solución de hidróxido sódico. La mezcla después se dejó agitar vigorosamente durante otras 3 horas a temperatura ambiente. La dispersión de nanopartículas después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializada es del 0,53 %.

Ejemplo 7

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietilfosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₆₀

Parte (a): preparación de ferrofluido acuoso diluido estable en medio ácido.

Se produjeron nanopartículas de magnetita siguiendo el método de Massart (Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE Transactions on Magnetics, 1981. MAG-17(2): p. 1247-1248). Se añadió una mezcla acuosa de cloruros férrico y ferroso a una solución de amoníaco. El precipitado resultante se aisló por centrifugación y después se oxidó a maghemita mezclando con solución de nitrato de hierro y calentamiento. El precipitado después se lavó en ácido nítrico 2 molar y después finalmente se peptizó con agua para formar un ferrofluido acuoso diluido de aproximadamente un 5 % de sólidos.

Parte (b): preparación de agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₆₀ usando ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico.

Se preparó una solución de ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico (0,26 g, 1,1 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,06 g, 0,2 mmol), acrilamida (0,2 g, 0,2 mmol) en dioxano (10 g) y agua (10 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se calentó a 70 °C durante 4 h. Al final de este período, se añadieron monoacriloxietil fosfato (2,17 g, 11,1 mmol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,06 g, 0,2 mmol) al matraz. La mezcla se desoxigenó y se continuó el calentamiento a 80 °C durante 12 horas más. La solución de copolímero tenía un 24 % de sólidos. La solución de copolímero después se diluyó con agua MQ al 0,7 % en peso y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M.

Parte (c): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso de la parte (a) y el agente macro RAFT del ejemplo 7 parte (b).

La dispersión de nanopartículas preparada en el ejemplo 7 parte (a) (40 g) se diluyó con agua MQ (200 g) para producir una dispersión del 1 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas después se elevó a 5 usando hidróxido sódico 0,1 M. La dispersión al 1 % en peso de la dispersión de óxido de hierro después se añadió a la solución de copolímero macro RAFT de la parte (b) (200 g). La mezcla se agitó vigorosamente con un agitador de hélice durante 45 minutos antes de ajustar el pH a pH 7 usando solución de hidróxido sódico. Después, la mezcla se dejó agitar vigorosamente durante otras 2 horas a temperatura ambiente. La dispersión de nanopartículas después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. Las partículas más grandes en la dispersión se retiraron por ultracentrifugación. La dispersión de nanopartículas purificada después se destiló para aumentar la carga de sólidos en la dispersión de ferrofluido acuosa a aproximadamente un 70 % en peso.

Ejemplo 8

Estabilización estérica partículas de sílice Ludox AS30 de Sigma usando agente macro RAFT de poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ al 95 % y reactivo macro RAFT de poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅ al 5 %

Parte (a): preparación de un agente macro RAFT de poli-[2-(dimetilamino)etil metacrilato]₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ basado en ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico.

Se preparó una solución de RAFT-PEO del ejemplo 2 parte (a) (1,38 g, 1,4 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,08 g, 0,3 mmol), metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo (2,13 g, 13,6 mmol) en dioxano (10 g) y agua (5 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos y la reacción se realizó a 70 °C durante 12 horas. La solución de copolímero tenía un 18,4 % de sólidos.

Parte (b): cuaternización selectiva de agente macro RAFT de poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ basado en ácido 2-[[butilsulfanil carbonotioil]sulfanil]propanoico.

5 Se diluyeron 16,5 g del ejemplo 8 parte (a) con agua MQ (17 g) y se añadió yoduro de metilo (0,7 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora antes de secarse parcialmente usando un evaporador rotatorio. Las muestras secadas después se pusieron en la estufa al vacío para secar el agente macro RAFT que produjo un 100 % de sólidos.

10 Parte (c): preparación de un agente macro RAFT de poli (2-(dimetilamino)etil metacrilato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅ basado en ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]-sulfanil]propanoico.

15 Se preparó una solución de ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico (0,6 g, 2,6 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,11 g, 0,4 mmol), acrilamida (4,45 g, 62,7 mmol) en dioxano (18,8 g) y agua (10,5 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se puso en un baño de aceite a 70 °C durante 4 h. La solución de homopolímero tenía un 32,7 % de sólidos. Se añadieron toda la solución de homopolímero obtenida, metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo (3,94 g, 25,1 mmol) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,088 g, 0,32 mmol) a un matraz de fondo redondo de 100 ml. La mezcla se desoxigenó durante 15 minutos y se puso en un baño de aceite a 70 °C durante 12 horas. El contenido final de sólidos de la solución de copolímero era del 26,9 %.

20 Parte (d): cuaternización selectiva de agente macro RAFT de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅ basado en ácido 2-[[butilsulfanil]carbonotioil]sulfanil]propanoico.

25 Se diluyó el ejemplo 8 parte (c) (19,3 g) con agua MQ (20 g) y se añadió yoduro de metilo (0,78 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se secó parcialmente usando un evaporador rotatorio. Las muestras parcialmente secadas después se pusieron en la estufa al vacío para secar el agente macro RAFT que produjo un 100 % de sólidos.

30 Parte (e): preparación de partículas de sílice Ludox AS30 de Sigma estabilizadas estéricamente usando una mezcla 95:5 de los agentes macro RAFT del ejemplo 8 parte (b) y ejemplo 8 parte (d)

35 Se diluyó Ludox AS30 de Sigma Aldrich (2,5 g) con agua MQ (100 g) para producir una dispersión al 2 % en peso de las nanopartículas y el pH era de 9,62. Una mezcla del ejemplo 8 parte (b) (0,96 g) y del ejemplo 8 parte (d) (0,0653 g) se disolvió en agua MQ (50 g) y el pH fue de 7,59. La dispersión al 2 % en peso después se vertió en la mezcla de agentes macro RAFT. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 horas a temperatura ambiente. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión fluida (sol) de sílice dializada fue del 0,69 %. El pH de la muestra se ajustó a 6,76 con solución de hidróxido sódico.

40 Parte (f): modificación de estabilizadores para partículas de sílice del ejemplo 8 parte (e) [documento EP341070A]

45 Se añadieron las partículas de sol de sílice estabilizadas estéricamente preparadas en el ejemplo 8 parte (e) (60 g), N-hidroxisuccinimida (NHS, 39,4 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 56,2 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 37 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) a la mezcla de reacción y se dejaron reaccionar durante 12 horas más. Después, la solución se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de la reacción.

50 Ejemplo 9

Estabilización estérica de sol de sílice Ludox AS40 de Sigma usando agente macro RAFT de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ al 95 % y agente macro RAFT de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅ al 5 %

55 Parte (a): preparación de partículas de sílice Ludox AS30 de Sigma estabilizadas estéricamente y una mezcla 95:5 de los agentes macro RAFT del ejemplo 8 parte (b) y ejemplo 8 parte (d)

60 Se diluyó Ludox AS40 de Sigma Aldrich (5,0 g) con 100 g de agua MQ para producir una dispersión al 2 % en peso de las nanopartículas y el pH fue de 9,97. Una mezcla de los agentes macro RAFT, que consistía en el ejemplo 8 parte (b) (1,72 g) y ejemplo 8 parte (d) (0,13 g), se disolvió en 100 g de agua MQ y el pH fue de 7,95. La dispersión al 2 % en peso después se vertió en la mezcla de agentes macro RAFT. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 horas a temperatura ambiente. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de sol de sílice dializada fue del 1,45 %. El pH de la muestra fue de 7,65.

65

Parte (b): modificación de estabilizadores de partículas de sílice del ejemplo 9 parte (a)

A las partículas de sol de sílice estabilizadas estéricamente preparadas en el ejemplo 9 parte (a) (30 g) se le añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 11,6 mg) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 16,6 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) (45,1 mg) a la mezcla de reacción y se dejaron reaccionar durante 12 horas más. La solución después se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de la reacción.

10 Ejemplo 10

Estabilización estérica de partículas de sílice de 130 nm usando agente macro RAFT de poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₅

15 Parte (a): se prepararon partículas de sílice usando los métodos de Costa et al.

(Carlos A. R. Costa, Carlos A. P. Leite, y Fernando Galembeck J. Phys. Chem. B, 2003, 107 (20), 4747-4755) para obtener partículas de sílice de 130 nm de diámetro a un 0,18 % de sólidos en agua.

20 Parte (b): estabilización estérica de las partículas de sílice de 130 nm de diámetro del ejemplo 10 parte (a) usando el agente macro RAFT del ejemplo 8 parte (d)

La dispersión de partículas de sílice del ejemplo 10 parte (a) (11,15 g) se diluyó con agua MQ (20 g) para producir una dispersión al 0,1 % en peso de las nanopartículas con un pH de 9,26. Se disolvió el agente macro RAFT del ejemplo 8 parte (d) (0,023 g) en 25 g de agua MQ (25 g) para producir una solución de pH 5,80. La dispersión de sílice y la solución de macro RAFT después se mezclaron y se agitaron vigorosamente durante 5 horas a temperatura ambiente. La dispersión después se centrifugó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de sílice estabilizada estéricamente fue del 0,81 %.

30 Ejemplo 11

Estabilización estérica de las partículas de sílice de 130 nm de diámetro del ejemplo 10 parte (a) usando el enfoque de "desarrollo a partir de".

Las partículas de sílice del ejemplo 10 parte (a) se funcionalizaron con RAFT usando 6-(trietoxisilil)hexil 2-(((metiltio)carbonotioil)-2-fenilacetato y se desarrollaron cadenas poliméricas que comprendían poli metoxi-PEG acrilato (Aldrich 454 g/mol) a partir de la superficie de las partículas de acuerdo con los métodos de Ohno *et al.* (Kohji Ohno, Ying Ma, Yun Huang, Chizuru Mori, Yoshikazu Yahata, Yoshinobu Tsujii, Thomas Maschmeyer, John Moraes, y Sébastien Perrier Macro-molecules, 2011, 44 (22), pág. 8944-8953). El peso molecular obtenido para cada cadena anclada fue de aproximadamente 56.000 g/mol. Las partículas finales se obtuvieron en agua a un contenido de sólidos de 10 mg/ml y el tamaño de las partículas fue de 258 nm, medido por DLS.

45 Ejemplo 12

Estabilización estérica de nanopartículas de oro de 10-15 nm en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(óxido de etileno)₁₇ al 95 % y agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀ al 5 %

50 Parte (a): síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato de 10-15 nm estables en medio acuoso.

Se prepararon nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (10-15 nm) usando el método de Frens (Frens, G. Nat. Phys. Sci. 1973, 241, 20-2). En resumen, todo el material de vidrio primero se lavó con una solución de aqua regia (ácido nítrico concentrado al 25 % en volumen y ácido clorhídrico concentrado al 75 % en volumen) y después se aclararon con agua Milli-Q varias veces y se secaron. Se calentaron a reflujo 100 ml de una solución acuosa que contenía ácido tetracloroáurico (III) trihidrato (0,01 g, 0,025 mmol) en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. En este matraz se añadieron 2 ml de solución de citrato trisódico dihidrato (0,02 g, 0,068 mmol). La solución se calentó hasta el punto de ebullición con agitación vigorosa. La ebullición y la agitación vigorosa se mantuvieron durante 30 min. Se observó un cambio progresivo del color de amarillo a rojo vino. La solución se enfrió, se dializó para deshacerse del exceso de citrato sódico y se conservó a 5 °C. La concentración de nanopartículas en la dispersión fue de 50 ppm.

Parte (b): preparación de agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀ usando: ácido 2-(((butilsulfanil)carbonotioil)sulfanil)propanoico.

65 Se preparó una solución de ácido 2-(((butilsulfanil)carbonotioil)sulfanil)propanoico (0,71 g, 3,0 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,04 g, 0,15 mmol), acrilamida (4,28 g, 60,2 mmol) en dioxano (7,5 g) y agua (7,5 g)

en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se puso en un baño de aceite a 70 °C con agitación continua durante 4 h. La solución de polímero tenía un 25,17 % de sólidos.

- 5 Parte (c): preparación de nanopartículas de oro de 10-15 nm estabilizadas estéricamente a partir de las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato del ejemplo 12 parte (a) y una mezcla 95:5 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (a) y el agente macro RAFT del ejemplo 12 parte (b).

10 Se transfirieron 100 ml de dispersión de nanopartículas de oro (50 ppm) del ejemplo 12 parte (a) a un matraz de fondo redondo de 250 ml. Después se añadió una solución de 10 ml que contenía 0,012 g del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (a) y 0,15 g del agente macro RAFT del ejemplo 12 parte (b). La mezcla se agitó vigorosamente con una barra de agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente y después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. La dispersión de nanopartículas purificada estaba a una concentración de 50 ppm y se conservó en el
15 frigorífico a 5 °C. Se observó que la dispersión de nanopartículas acuosa resultante era estable en solución salina tamponada con fosfato.

Parte (d): modificación de estabilizadores para nanopartículas de oro del ejemplo 12 parte (c)

20 En nanopartículas recubiertas preparadas a partir del ejemplo 12 parte (c) (100 ml), se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 4 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDAC: 4,1 mg), se mezcló por agitación y se dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadió una solución de diamina (21 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) en 2 ml de agua) a la mezcla de reacción y se dejó reaccionar durante 3,5 horas más. La solución después se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios para
25 retirar el EDAC libre y los subproductos de la reacción.

Ejemplo 13

30 Estabilización estérica de nanopartículas de oro de 3-8 nm dispersadas en medio acuoso usando poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol

Parte (a): modificación con tiol de agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀ del ejemplo 12 parte (b) usando isopropil amina.

35 Se preparó una solución del agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀ del ejemplo 12 parte (b) (1 g, 0,6 mmol), isopropilamina (1,77 g, 30 mmol) en dioxano (7,5 g) y agua (7,5 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos, y después se dejó reaccionar durante 24 horas a 25 °C. Al final de este período, el polímero se precipitó en éter dietílico (50 ml). Los precipitados se separaron de la mezcla de reacción por filtración y se secaron al vacío usando un evaporador rotatorio. La
40 poli(acrilamida)₂₀ con grupos tiol terminales seca se purgó con nitrógeno durante 15 minutos y se conservó en un recipiente hermético al aire a 20 °C.

Parte (b): preparación de nanopartículas de oro de 3-8 nm estabilizadas estéricamente en dispersión acuosa usando poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol del ejemplo 13 parte (a).

45 Se sometió a reflujo agua Milli-Q (250 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. Después se añadieron 25 ml de una solución acuosa que contenía ácido tetracloroáurico (III) trihidrato (0,0571 g, 0,1444 mmol) y la solución se calentó a ebullición. Después, se añadió una solución en agua (25 ml) de citrato trisódico dihidrato (0,5 g, 1,7 mmol) y poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol (0,12 g, 0,0779 mmol) del ejemplo 13 parte (a) y la reacción se realizó durante 2 horas a 25 °C. Al final de este período, el color de la solución se volvió de amarillo a rojo vino.
50 La relación molar entre el estabilizador estérico y el ácido tetracloroáurico (III) trihidrato en este caso es de 0,5. Las nanopartículas de oro se separaron de la dispersión por centrifugación a 52.000 g durante 30 min. Las nanopartículas se redispersaron en agua Milli-Q a una concentración de 190 ppm. El tamaño de las nanopartículas de oro obtenidas de TEM fue 3-8 nm.

55 Ejemplo 14

60 Estabilización estérica de nanopartículas de oro de 8-10 nm dispersadas en medio acuoso usando poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol del ejemplo 13 parte (a)

65 Se calentó a reflujo agua Milli-Q (250 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. Se añadieron 25 ml de una solución acuosa que contenía ácido tetracloroáurico (III) trihidrato (0,0652 g, 0,16 mmol) y la solución se calentó a ebullición. Después, se añadió una solución en agua (25 ml) de citrato trisódico dihidrato (0,5 g, 1,7 mmol) y poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol (0,022 g, 0,0142 mmol) del ejemplo 13, parte (a) y se dejó reaccionar durante 2 horas a 25 °C. Al final de este período, el color de la solución se volvió de amarillo a rojo vino. La relación molar entre estabilizador estérico y ácido tetracloroáurico (III) trihidrato en este caso fue de 0,09. Las nanopartículas de oro

se separaron de la dispersión por centrifugación a 52.000 g durante 30 min. Las nanopartículas se redispersaron en agua Milli-Q a una concentración de 390 ppm. El tamaño de las nanopartículas de oro obtenidas a partir de TEM fue de 8-10 nm.

5 Ejemplo 15

Estabilización estérica de nanopartículas de oro de 30-40 nm dispersadas en medio acuoso usando la poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol del ejemplo 13 parte (a)

10 Parte (a): síntesis de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato de 30-40 nm estables en medio acuoso.

Se prepararon nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (30-40 nm) usando el método de Frens (Frens, G. Nat. Phys. Sci. 1973, 241, 20-2). En resumen, todo el material de vidrio primero se lavó con una solución de agua regia (ácido nítrico concentrado al 25 % en volumen y ácido clorhídrico concentrado al 75 % en volumen), después se aclaró con agua Milli-Q varias veces y se secó. Se calentaron a reflujo 100 ml de una solución acuosa que contenía ácido tetracloroáurico (III) trihidrato (0,01 g, 0,025 mmol) en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. Después se añadió 1 ml de solución de citrato trisódico dihidrato (0,01 g, 0,034 mmol). La solución se calentó a ebullición con agitación vigorosa. La ebullición y la agitación vigorosa se mantuvieron durante 30 min. Se observó un cambio progresivo de color de amarillo a rojo vino. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se dializó para eliminar el exceso de citrato sódico y se almacenó a 5 °C. La concentración de nanopartículas en la dispersión fue de 50 ppm.

25 Parte (b): preparación de nanopartículas de oro de 30-40 nm estabilizadas estéricamente a partir de la dispersión acuosa de nanopartículas de oro del ejemplo 15 parte (a) y la poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol del ejemplo 13 parte (a).

Se pusieron 100 ml de dispersión de nanopartículas de oro (50 ppm) del ejemplo 15 parte (a) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Después se añadieron 10 ml de solución acuosa del ejemplo 13 parte (a) que contenía poli(acrilamida)₂₀ modificada con tiol (0,0068 g, 0,0044 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente con una barra de agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente y después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. La dispersión de nanopartículas purificada después se destiló para aumentar la carga de sólidos en la dispersión acuosa de nanopartículas a 192 ppm. Se observó que la dispersión acuosa de nanopartículas resultante era estable en solución salina tamponada con fosfato.

35 Ejemplo 16

Síntesis de nanopartículas de poliestireno en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(estireno)₉-b-poli(acrilamida)₁₅

40 Parte (a): preparación de agente macro RAFT de poli(estireno)₉-b-poli(acrilamida)₁₅ autoensamblado usando: ácido 2-{{(butilsulfanil)carbonotioil}sulfanil}propanoico.

Se preparó una solución de ácido 2-{{(butilsulfanil)carbonotioil}sulfanil}propanoico (0,80 g, 3,36 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,10 g, 0,36 mmol), acrilamida (3,71 g, 52,06 mmol) en dioxano (6,61 g) y agua (4,41 g) en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 10 minutos. El matraz después se calentó a 70 °C durante 5 h para producir la solución de homopolímero transparente. Al final de este período, se añadieron estireno (3,16 g, 30,3 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (0,19 g, 0,69 mmol), dioxano (21,15 g) y agua (6,14 g) al matraz. La mezcla se agitó y se desoxigenó con nitrógeno durante 10 minutos. El matraz después se sumergió de nuevo en un baño de aceite a 70 °C durante una noche con agitación constante.

55 Parte (b): síntesis de nanopartículas de poliestireno usando el agente macro RAFT autoensamblado preparado en el ejemplo 16 parte (a)

A una dispersión transparente de agente macro RAFT del ejemplo 16 parte (a) (1,00 g) en un matraz de fondo redondo de 50 ml sobre un agitador magnético, se le añadió solución de hidróxido sódico (1,94 g de solución al 0,3 %, 0,15 mmol con agua (22,1 g)) gota a gota. A esta mezcla se le añadió estireno (1,109 g, 10,5 mmol) y se agitó durante una noche. Se añadieron 4,4'- azobis(ácido 4-cianoaléxico) (15,5 mg, 0,055 mmol) y solución de hidróxido sódico (1,04 g de solución al 3%, 0,78 mmol). El matraz se agitó durante 2 horas, después se cerró herméticamente y posteriormente se desoxigenó con purga de nitrógeno durante 10 minutos. El matraz entero se sumergió en un baño de aceite con una temperatura fijada de 80 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 5 horas con agitación magnética constante. El látex contenía partículas con un diámetro medio de 15 nm por dispersión de luz en un Zetasizer. El látex se dializó frente a agua mili-Q para retirar las impurezas.

65

Ejemplo 17

Síntesis de nanopartículas de poliestireno en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(estireno)₉-b-poli(acrilamida)₂₀ autoensamblado del ejemplo 16 parte (a)

5 Parte (a): desarrollo adicional del agente macro RAFT autoensamblado del ejemplo 16 parte (a) para formar macro RAFT de poli(estireno)₅₂-b-poli(acrilamida)₂₀.

10 A una dispersión transparente de agente macro RAFT del ejemplo 16 parte (a) (1,02 g) en un matraz de fondo redondo de 25 ml sobre un agitador magnético, se le añadieron solución de hidróxido sódico (0,44 g de solución al 3 %, 0,33 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (14,1 mg, 0,05 mmol) y agua (14,0 g) y se agitó hasta la disolución. A esta mezcla se le añadió estireno (0,61 g, 5,85 mmol) y se agitó durante una noche. El matraz después se cerró herméticamente y posteriormente se desoxigenó con purga de nitrógeno durante 10 minutos. El matraz entero se sumergió en un baño de aceite con una temperatura fijada de 70 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 6 horas con agitación magnética constante. Se obtuvo una dispersión transparente.

15 Parte (b): síntesis de nanopartículas de poliestireno usando la dispersión de agente macro RAFT preparada en el ejemplo 17 parte (a)

20 A una solución transparente de agente macro RAFT del ejemplo 17 parte (a) (6,99 g) en un matraz de fondo redondo de 50 ml en un agitador magnético, se añadieron solución de hidróxido sódico (0,36 g de una solución al 3 %, 0,27 mmol), 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (26,6 mg, 0,095 mmol), estireno (0,45 g, 4,37 mmol) y agua (8,31 g). El matraz se agitó durante 5 horas, después se cerró herméticamente y posteriormente se desoxigenó con purga de nitrógeno durante 10 minutos. El matraz entero se sumergió en un baño de aceite con una temperatura fijada de 70 °C y se mantuvo a esa temperatura durante una noche con agitación magnética constante. El látex contenía partículas con un diámetro medio de 47 nm por dispersión de luz en un Zetasizer. El látex se dializó frente a agua mili-Q para retirar las impurezas.

Ejemplo 18

30 Síntesis de nanopartículas de poliestireno en dispersión acuosa usando agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀

35 Parte (a): preparación de agente macro RAFT de poli(acrilamida)₂₀ usando: ácido 2-((butilsulfanil)carbonotioil/sulfanil)propanoico.

40 Se preparó una solución de ácido 2-((butilsulfanil)carbonotioil)sulfanil)propanoico (0,73 g, 3,08 mmol), 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) (0,07 g, 0,3 mmol), acrilamida (4,30 g, 60,5 mmol) en dioxano (15 g) y agua (7,5 g) en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Esta se agitó magnéticamente y se purgó con nitrógeno durante 15 minutos. El matraz después se calentó a 70 °C durante 4 horas para producir la solución de homopolímero transparente.

45 Parte (b): síntesis de nanopartículas de poliestireno usando el agente macro RAFT preparado en el ejemplo 18, parte (a)

50 Se preparó una solución transparente de agente macro RAFT del ejemplo 18 parte (a) (1,05 g), hidróxido sódico (2,07 g de solución al 3 %, 1,55 mmol) y agua (12,16 g) en un matraz de fondo redondo de 25 ml, con agitación en un agitador magnético. A esta solución, se le añadieron 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (13,6 mg, 0,049 mmol), dioxano (1,1 g) y estireno (1,125 g, 10,8 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas para obtener una mezcla de tipo emulsión. El matraz se cerró herméticamente y posteriormente se desoxigenó con purga de nitrógeno durante 10 minutos. El matraz entero se sumergió en un baño de aceite con una temperatura fijada a 70 °C y se mantuvo a esa temperatura durante una noche bajo agitación magnética constante. El látex contenía partículas con un diámetro medio de 200 nm por dispersión de luz en un Zetasizer. El látex se dializó frente a agua mili-Q para retirar las impurezas.

Ejemplo 19

55 Estabilización de nanopartículas de óxido de hierro con partículas recubiertas con dextrano de *leuconostoc mesenteroides* (peso molecular medio de 9000-11.000, Sigma Aldrich) (el ejemplo 19 es un ejemplo comparativo)

60 Se mezclaron 25 ml de FeCl₂/4H₂O 0,5 M y 25 ml de FeCl₃/6H₂O 1 M y se agitaron magnéticamente en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. La solución resultante se diluyó añadiendo 100 ml de agua MQ y se puso en un baño de aceite a 70 °C. Se añadió solución de dextrano (50 ml de un 15 % de sólidos en agua) y la solución se mantuvo en el baño de aceite durante 10 minutos. Después se añadió solución de amoníaco (30 ml, 28 %) y la mezcla se mantuvo a 70 °C durante 45 minutos más. El producto de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se dializó frente a agua MQ para retirar el exceso de amoníaco. El agua se cambió al menos tres veces. Se retiraron los agregados de mayor tamaño por sedimentación magnética. El volumen se redujo a aproximadamente 100 ml

retirando agua en un evaporador rotatorio. La dispersión final se sonicó a AMP 70 % usando un ultrasonificador durante 10 minutos y también a AMP 30 % durante 30 minutos.

Ejemplo 20

5 Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro del ejemplo 1 parte (a) usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ al 50 % del ejemplo 2 parte (b) y agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ al 50 %

10 Parte (a): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) y una mezcla 50:50 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c).

15 Se diluyó ferrofluido acuoso preparado de acuerdo con el ejemplo 1 parte (a) (8,10 g) con agua MQ (50 g) para producir una dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Se mezcló una mezcla de macro RAFT que consistía en 50 g de sólidos al 5,1 % en peso, de los que el 3,3 % era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el 1,8 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c), y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M. La dispersión de óxido de hierro, mantenida al mismo pH, después se añadió a la mezcla de macro RAFT. La mezcla se agitó vigorosamente durante 20 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a 7,0. La mezcla después se dejó en agitación durante otras 12 horas. A este pH, el copolímero se mantuvo parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializada fue del 25 0,6 %.

Parte (f): modificación de estabilizadores de partículas de óxido de hierro del ejemplo 20 parte (a)

30 A nanopartículas recubiertas preparadas a partir del ejemplo 20 parte (a) (70 g), se les añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 89,3 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDAC, 127 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 291 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) a la mezcla de reacción y se dejó reaccionar durante 12 horas más. Después, la solución se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de reacción.

Ejemplo 21

40 Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro del ejemplo 1 parte (a) usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ del ejemplo 2 parte (b) y agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina al 20%

45 Parte (a): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) y una mezcla 80:20 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el agente macro-RAFT del ejemplo 2 parte (c).

50 Se diluyó ferrofluido acuoso preparado de acuerdo con el ejemplo 1 parte (a) (8,10 g) con agua MQ (50 g) para producir una dispersión del 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Se mezclaron una mezcla de macro RAFT que consistía en 50 g de sólidos al 60 % en peso, de los que el 5,28 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el 0,72 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c) y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M. Después se añadió a la mezcla de macro RAFT la dispersión de óxido de hierro, mantenida al mismo pH. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a 7,0. La mezcla después se dejó en agitación durante otras 12 horas. A este pH, el copolímero se mantuvo parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La 55 dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializado fue del 0,7 %.

Parte (b): modificación de estabilizadores de partículas de óxido de hierro del ejemplo 21 parte (a)

60 A nanopartículas recubiertas preparadas a partir del ejemplo 2 parte (e) (60 g) se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 39,4 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 56,2 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 130 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) a la mezcla de reacción y se dejaron reaccionar durante 12 horas más. La solución después se dializó frente a exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de reacción.

Ejemplo 22

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro del ejemplo 1 parte (a) usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ al 90 % del ejemplo 2 parte (b) y agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina al 10 %

Parte (a): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) y una mezcla 90:10 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c).

Se diluyó ferrofluido acuoso preparado de acuerdo con el ejemplo 1 parte (a) (8,10 g) con agua MQ (50 g) para producir una dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Se combinó una mezcla de macro RAFT que consistía en 50 g de un 6,3 % en peso de sólidos, de los que un 6,4 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y un 5,9 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c) y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M. Después se añadió a la mezcla de macro RAFT la dispersión de óxido de hierro, mantenida al mismo pH. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a 7,0. Después, la mezcla se dejó en agitación durante otras 12 horas. A este pH, el copolímero permaneció parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializada fue del 0,87 %.

Parte (b): modificación con amina de estabilizadores para partículas de óxido de hierro del ejemplo 22 parte (a)

En nanopartículas recubiertas preparadas a partir del ejemplo 2 parte (a) (60 g), se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 27,7 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 34 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 18,2 mg de 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) a la mezcla de reacción y se dejaron reaccionar durante 12 horas más. La solución después se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de reacción.

Ejemplo 23

Estabilización de nanopartículas de óxido de hierro con dextrano de *leuconostoc mesenteroides* (peso molecular medio de 35.000-45.000 de Sigma Aldrich) (el ejemplo 23 es un ejemplo comparativo)

Se agitaron magnéticamente 25 ml de FeCl₂/4H₂O 0,5 M en soluciones y 25 ml de FeCl₃/6H₂O 1 M en solución en un matraz de fondo redondo de 500 ml de 3 bocas. La mezcla de solución se diluyó añadiendo 100 ml de agua Mili-Q y la solución resultante se puso en un baño de aceite a 70 °C. Después de 10 minutos se añadió solución de dextrano (15 %, 50 ml) seguida de solución de amoníaco (28 %, 30 ml). La mezcla se mantuvo a 70 °C durante 45 minutos más. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se dializó frente a agua MQ para retirar el exceso de amoníaco. El agua se cambió al menos tres veces. Los agregados de mayor tamaño se retiraron por sedimentación magnética. El volumen de la dispersión se redujo a aproximadamente 100 ml usando un evaporador rotatorio. La dispersión final se sonicó a AMP 70 % usando un ultrasonificador durante 10 minutos seguido de sonicación a AMP 30 % durante 30 minutos.

Ejemplo 24

Estabilización estérica de nanopartículas de óxido de hierro del ejemplo 1 parte (a) usando agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(óxido de etileno)₁₇ al 98 % y agente macro RAFT de poli(monoacriloxietil fosfato)₁₀-bloque-poli(acrilamida)₂₀ modificado con amina al 2 %

Parte (a): preparación de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas estéricamente a partir del ferrofluido acuoso del ejemplo 1 parte (a) y una mezcla 98:2 del agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c). [documento EP341063]

Se diluyó ferrofluido acuoso preparado de acuerdo con el ejemplo 1 parte (a) (8,10 g) con agua MQ (50 g) para producir una dispersión al 0,5 % en peso de las nanopartículas. El pH de esta dispersión de nanopartículas preparada después se elevó a 5. Se combinó completamente una mezcla de macro RAFT que consistía en 50 g de sólidos al 6,48 % en peso, de los que el 6,4 % era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (b) y el 0,08 % en peso era el agente macro RAFT del ejemplo 2 parte (c) y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 0,1 M. Después se añadió a la mezcla de macro RAFT la dispersión de óxido de hierro mantenida al mismo pH. La mezcla se agitó vigorosamente durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ajustar el pH a 7,0. La mezcla después se dejó en agitación durante otras 12 horas. A este pH, el copolímero permaneció parcialmente neutralizado mientras que las nanopartículas estaban suficientemente por encima de su punto de carga cero como para ser también estables. La

dispersión después se dializó para retirar las sales, disolventes residuales, productos secundarios de la reacción de bajo peso molecular indeseados y polímero no unido. El contenido de sólidos de la dispersión de ferrofluido acuoso dializada fue del 0,8 %.

5 Parte (b): modificación con amina de estabilizadores para partículas de óxido de hierro del ejemplo 24 parte (a)

10 A las nanopartículas recubiertas preparadas a partir del ejemplo 24 parte (a) (55 g), se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS, 5,1 mg) y después 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, 6,8 mg), se mezclaron por agitación y se dejaron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se añadieron 2,2'-(etilendioxi)bis-(etilamina) (18,2 mg) a la mezcla de reacción que se dejó reaccionar durante 12 horas más. La solución después se dializó frente a un exceso de agua con numerosos cambios, para retirar el EDAC libre y los subproductos de la reacción.

15 Ejemplo 25

Método general para la preparación de esferoides

20 Se obtuvieron células de cáncer de colon DLD-1 humanas y células de cáncer de ovario PA-1 humanas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA, Estados Unidos). Las células se mantuvieron en medio completo (Advanced DMEM (Invitrogen) y complementado con suero bovino fetal al 2 % (Sigma) y Glutamax™ 2 mM (Invitrogen)) a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Se formaron esferoides cultivando 1,5 x 10⁵ células/ml en placas de 96 pocillos recubiertas con agarosa para formar imágenes (BD Biosciences) y las células se dejaron agregar durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ dando como resultado la formación de un solo esferoide por pocillo.

25 Ejemplo 26

Evaluación de la citotoxicidad de compuestos activos y nanopartículas

30 Se diluyeron compuestos activos y/o nanopartículas, según fue necesario, en medio de células inmediatamente antes del ensayo. La citotoxicidad se determinó usando el ensayo MTT como se indica. Se sembraron 1 x 10⁵ células en cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo plano y se dejaron adherir durante una noche. Se añadieron soluciones de compuestos +/- nanopartículas a los pocillos por triplicado, a concentraciones que abarcaban un intervalo 4-log y se incubaron durante 72 horas. Se añadió MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) (1,0 mM) a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas más. Se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, se añadió DMSO (150 µl), la placa se agitó durante 5 segundos y la absorbancia se midió inmediatamente a 600 nm en un lector de microplacas Victor³V (Perkin Elmer). Los valores de CI₅₀ se determinaron como la concentración de fármaco que reducía la absorbancia al 50 % de la de los pocillos de control no tratados. Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada compuesto con lecturas por triplicado en cada experimento. Los valores de citotoxicidad para todos los compuestos activos usados se presentan en la Tabla 2.

Ejemplo 27

45 Método general para tratar esferoides para cáncer del ejemplo 5 con (a) nanopartículas solas, (b) coadministración de nanopartículas y compuesto activo o (c) tratamiento en un periodo de tiempo primero con nanopartículas y después con compuesto activo

50 Todas las nanopartículas se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,22 µm o por esterilización en autoclave a 120 °C, 2 KPa durante 20 min en un esterilizador de vapor de alta presión Tomy ES-315 antes del uso en los ensayos celulares.

55 (a) En la suspensión de los esferoides de 3 días de edad del ejemplo 25, se añadieron 100 µl de una solución que contenía nanopartículas en medio completo a cada esferoide, para producir una concentración final de partículas de 10 ppm en un volumen total de 200 µl. Los esferoides se reemplazaron en una incubadora a 37 °C, con 5 % de CO₂. Después de 24 horas de incubación, las nanopartículas en el medio se retiraron lavando con exceso de solución salina tamponada con fosfato antes de la experimentación adicional.

60 (b) En la suspensión de los esferoides de 3 días de edad del ejemplo 25, se añadieron 100 µl de una solución que contenía compuesto activo y nanopartículas en medio completo a cada esferoide, para producir una concentración final de partículas de 10 ppm. La concentración de los compuestos activos usados se define en la Tabla 3. Los esferoides se reemplazaron en una incubadora a 37 °C, en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Después de 24 horas de incubación, el compuesto activo libre y las nanopartículas en el medio se retiraron lavando con exceso de solución salina tamponada con fosfato.

65 (c) En la suspensión de los esferoides de 3 días del ejemplo 25, se añadieron 100 µl de una solución que contenía nanopartículas en medio completo a cada esferoide, para producir una concentración final de partículas de 10 ppm. Los esferoides se reemplazaron en una incubadora a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Después de 24 horas de incubación, los esferoides se dosificaron con un compuesto activo a la concentración indicada en la

Tabla 2 y se incubaron durante 24 horas más a 37 °C con un 5 % de CO₂. El compuesto activo libre y las nanopartículas en el medio se retiraron lavando con exceso de solución salina tamponada con fosfato antes de la experimentación adicional.

5 Ejemplo 28

Método general para obtener imágenes de esferoides tratados con nanopartículas y un compuesto activo fluorescente por microscopía confocal

10 Se trataron esferoides del ejemplo 25 como en el ejemplo 27b y 27c y después se transfirieron a una placa de 35 mm de fondo de vidrio (Mattek) y se obtuvieron imágenes en un microscopio confocal Olympus FV1000 usando una lente de objetivo aéreo Olympus UPLAPO 10x/0,40. Se tomaron imágenes confocales individuales a través de la región central del esferoide. Los parámetros de excitación y emisión fueron dependientes del fluoróforo: doxorubicina ex: 559 nm em: 575-675; Mitoxantrona ex: 405 nm, em: 575-675.

15 Ejemplo 29

Método general para medir la eficacia del compuesto activo +/- nanopartículas en esferoides (ensayo de excrecencia)

20 Se trataron esferoides del ejemplo 25 como en el ejemplo 27b y 27c. Los esferoides después se transfirieron a una placa de 24 pocillos usando una pipeta de transferencia de calibre ancho y el medio se reemplazó con 1 ml de medio nuevo en cada pocillo. Los esferoides después se incubaron durante 48 horas a 37 °C en un entorno humidificado con un 5 % de CO₂, dejando que el esferoide se adhiriera a la placa, y las células formaran una excrecencia desde el esferoide sobre la superficie de la placa. Después se añadió Hoechst 33342 a los pocillos y se incubaron durante 25 30 minutos a 37 °C en un entorno humidificado con un 5 % de CO₂. Se tomaron imágenes de fluorescencia de campo ancho de los núcleos teñidos con Hoechst 33342 y de campo brillante de las células que habían formado excrecencias a partir de los esferoides (Olympus CellR). Para cuantificar la excrecencia, se contó el número de núcleos dentro de un ángulo de 60° desde el borde del esferoide. Estos valores después se representaron en un gráfico normalizado con respecto a los esferoides tratados con compuesto activo solo o esferoides de control no 30 tratados con fines comparativos.

Ejemplo 30

35 Las nanopartículas estabilizadas estéricamente también son capaces de penetrar en esferoides

Se trataron esferoides del ejemplo 25 como en el ejemplo 27a con partículas del ejemplo 2 y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, seguido de la fijación primaria con solución de glutaraldehído al 2,5 % y fijación secundaria con tetróxido de osmio al 1 %. Los esferoides se lavaron y después se deshidrataron en un gradiente de 40 etanol y se infiltraron con Resina de Spurr. Se cortaron secciones ultrafinas con un espesor nominal de 95 nm, se pusieron en rejillas de malla y se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se obtuvieron imágenes TEM de las secciones de esferoide usando un TEM JEOL 1400 a 120 kV.

45 Las imágenes de la Figura 1 se tomaron a partir de la región central del esferoide y muestran una acumulación de nanopartículas (áreas teñidas más oscuras indicadas con flechas) dentro del citoplasma de las células. La región ampliada indicada por el recuadro muestra las nanopartículas individuales bien dispersadas.

Ejemplo 31

50 El efecto de nanopartículas sobre la difusión de fármaco

Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27a con nanopartículas de los ejemplos 2, 3 y 5 y se obtuvieron imágenes en las condiciones descritas en el ejemplo 28. La doxorubicina sola se difundía aproximadamente 70 μm dentro del esferoide. La coadministración de doxorubicina y 55 NP3 o 5 aumentaba la penetración en el esferoide de doxorubicina a aproximadamente 100 μm. Por el contrario, la coadministración de NP2 y doxorubicina daba como resultado una difusión de doxorubicina a través de todo el esferoide (Figura 2A). La mitoxantrona sola también se difundía aproximadamente 70 μm dentro del esferoide. La coadministración de NP3 y mitoxantrona tuvo poco efecto sobre la difusión de mitoxantrona, mientras que la coadministración de mitoxantrona y NP2 o NP5 aumentaba significativamente la difusión de mitoxantrona en el 60 esferoide (Figura 2B).

Ejemplo 32

El efecto de nanopartículas sobre la viabilidad de esferoides

65

Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27a con nanopartículas de los ejemplos 1, 2, 4, 8, 9, 12, 13, 15, 16 y 18. La eficacia de las nanopartículas solas en esferoides se evaluó según el ejemplo 29. Se descubrió que la mayoría de las nanopartículas ensayadas tenían poco efecto citotóxico como se muestra en la Figura 3.

5 Ejemplo 33

El efecto de nanopartículas con diferentes tipos de núcleo sobre la viabilidad de esferoides cuando se coadministran con doxorubicina.

10 Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con nanopartículas de los ejemplos 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18 y doxorubicina. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. La Figura 4 muestra que la coadministración de nanopartículas NP2 (núcleo de hierro), NP11 (núcleo de sílice), NP12 (núcleo de oro) y NP18 (núcleo de poliestireno) con doxorubicina era más eficaz que el tratamiento con doxorubicina solo como se demuestra por la menor excrecencia celular en los esferoides. La composición del núcleo de nanopartículas no se correlaciona con la eficacia.

Ejemplo 34

20 El efecto de las nanopartículas con diferentes tamaños de núcleo sobre la viabilidad de esferoides cuando se coadministran con doxorubicina.

25 Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con nanopartículas de los ejemplos 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 y 18 y doxorubicina. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. Se mostró que varias nanopartículas diferentes con un intervalo de tamaños de núcleo de 10 nm a 200 nm, cuando se coadministraban con doxorubicina, eran más eficaces que la doxorubicina sola (Figura 5). Se demostró que la coadministración de las partículas NP1, NP2, NP12 y NP18 coadministradas con doxorubicina era aproximadamente un 50 % más eficaz que el tratamiento con doxorubicina solo.

30 Ejemplo 35

El efecto del grupo final del estabilizador funcionalizado sobre la viabilidad de esferoides cuando se coadministra con doxorubicina.

35 Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4, 5, 20, 21, 22 y 24 y doxorubicina. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. Se observó que el grupo terminal funcionalizado con amina afectaba a la viabilidad de los esferoides cuando se coadministraba con doxorubicina. Al variar el porcentaje de grupos funcionalizados con amina sobre la superficie de las nanopartículas, se observó que las partículas que contenían entre un 5-20 % de grupos terminales funcionalizados con amina eran las más eficaces cuando se coadministraban con doxorubicina. La doxorubicina era más eficaz cuando se coadministraba con nanopartículas que contenían estabilizadores con grupos terminales funcionalizados con amina al 5%.

Ejemplo 36

45 Nanopartículas de diferentes núcleos estabilizadas con grupos terminales funcionalizados con amina al 5 % coadministradas con esferoides con doxorubicina.

50 Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 8, 9, y 12 y doxorubicina. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. Se fabricaron nanopartículas estabilizadas con grupos terminales funcionalizados con amina al 5% con diferentes núcleos y se demostró que todos eran más eficaces que la doxorubicina sola y tenían un nivel similar de eficacia cuando se coadministraban con doxorubicina (Figura 7).

Ejemplo 37

55 Efecto de los compuestos activos cuando se coadministran con nanopartículas sobre la viabilidad de esferoides obtenidos a partir de dos líneas de células cancerosas diferentes.

60 Se prepararon esferoides DLD-1 y PA-1 según el ejemplo 25 y se dosificaron siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4 y 5 y compuestos activos. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. La mayoría de las partículas y compuestos activos tenían una eficacia similar entre las dos líneas celulares, con la excepción de la mitoxantrona. La coadministración de mitoxantrona y nanopartículas fue significativamente más eficaz en la línea celular de cáncer de ovario de células PA-1 en comparación con la línea de cáncer colorrectal DLD-1

65

Ejemplo 38

Ejemplo comparativo entre la coadministración de nanopartículas y compuestos activos y la administración de nanopartículas con la administración retardada de compuestos activos en dos líneas celulares diferentes.

5 Se prepararon esferoides de DLD-1 y PA-1 según el ejemplo 25 y se dosificaron siguiendo el protocolo del ejemplo 27b y 27c con las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 3, 4 y 5 y compuestos activos. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. Las Figuras 9 y 10 muestran que, para algunas combinaciones de partículas y activos, por ejemplo, 5FU+NP3, no hay diferencia en eficacia en ninguna línea celular para ningún modo de tratamiento. En general, sin embargo, hay poca correlación entre el programa de tratamiento y la eficacia entre las dos líneas celulares ensayadas. Será importante determinar qué combinación de nanopartícula/activo es la más eficaz para cada tipo de cáncer. Debe indicarse que la mitoxantrona requiere la coadministración de nanopartículas en células PA-1 para conseguir mayor eficacia.

15 Ejemplo 39

Ejemplos de la combinación coadministrada más eficaz de nanopartículas y compuesto activo para cada compuesto activo ensayado.

20 Se prepararon esferoides de DLD-1 y PA-1 según el ejemplo 25 y se dosificaron siguiendo el protocolo del ejemplo 27b con las nanopartículas indicadas en los ejemplos 2, 5, 14, 20, 21 y 22 y compuestos activos. La eficacia se determinó según el ejemplo 29. Los resultados presentados son para las nanopartículas más eficaces coadministradas con cada compuesto activo tanto en esferoides DLD-1 (Figura 11A) como en esferoides PA-1 (Figura 11B).

25 Ejemplo 40

Tratamiento de esferoides de cáncer del ejemplo 25 con las nanopartículas de óxido de hierro de los ejemplos 1 y 2 para permitir la penetración de los esferoides por cisplatino.

30 Se dosificaron esferoides DLD-1 preparados según el ejemplo 25 con 100 µl de solución de medio completo que contenía cisplatino y nanopartículas de óxido de hierro de los ejemplos 1 y 2 para producir una concentración final tanto de cisplatino como de óxido de hierro de 6 ppm. Los esferoides con partículas de óxido de hierro y cisplatino se repusieron en la incubadora y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Después de 48 horas de incubación, el cisplatino libre y las nanopartículas en el medio se lavaron con solución salina tamponada con fosfato en exceso. El análisis por espectroscopía de absorción atómica mostró que, después de 48 horas de incubación, la concentración de cisplatino en los esferoides con nanopartículas NP1, nanopartículas NP2 y sin partículas de óxido de hierro era 0,60, 0,63 y 0,20 ppb, respectivamente, un aumento de 3 veces en la acumulación de cisplatino cuando estaban presentes las nanopartículas.

40 Ejemplo 41

Ejemplo comparativo: penetración de doxorubicina en esferoides cuando se coadministran con partículas estabilizadas estéricamente ancladas en comparación con la coadministración con partículas estabilizadas estéricamente no ancladas.

50 Se dosificaron esteroides DLD-1 del ejemplo 25 con NP2 (ejemplo 2), que son partículas recubiertas con un estabilizador que contiene un grupo de anclaje a fosfato, o NP19 o NP23 (ejemplos 19 y 23), que son partículas recubiertas con un estabilizador que no tiene parte de anclaje como en el ejemplo 27b. Después se tomaron imágenes de los esferoides por microscopía confocal (según el ejemplo 28) para visualizar la fluorescencia de doxorubicina. Los esferoides tratados con doxorubicina y NP2 tenía significativamente más fluorescencia de doxorubicina en el centro del esferoide en comparación con los esferoides tratados con doxorubicina sola y los esferoides tratados con doxorubicina coadministrados con las partículas estabilizadas estéricamente no ancladas NP19 y NP23 (Figura 12).

55 Ejemplo 42

Régimen de ensayo potencial para determinar la nanopartícula y compuesto activo más eficaces para los tumores de los pacientes.

60 Para identificar qué tipo o tipos de nanopartícula y qué tipo o tipos de fármaco activo y la combinación óptima de nanopartículas y fármaco más eficaces para un paciente individual, inicialmente se ensayaron biopsias de tumores. Se tomaron varias biopsias de tumor central de un paciente, se diseccionaron en muestras más pequeñas (aproximadamente 1 mm³) y se dosificaron con combinaciones de nanopartícula/fármaco seleccionadas. Cada muestra dosificada se flanqueó por una muestra no tratada y un fármaco solo para controlar la variabilidad intratumoral. Después de 24 horas, la muestra se sometió a un ensayo de excrecencia para medir la eficacia de los

tratamientos tumorales con nanopartículas/fármaco para determinar la composición y la administración más eficaces de nanopartículas y fármaco.

5

Tabla 1. LISTA DE NANOPARTICULAS USADAS PARA EJEMPLIFICAR ESTA PATENTE

| Ejemplo | NP | Núcleo NP, diámetro | Tipo de recubrimiento |
|---------|------|---|-------------------------------|
| 1 | NP1 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 100 % diCOO |
| 2 | NP2 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 95 % PEG 5 % NH ₂ |
| 3 | NP3 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 100 % PEG(CH ₃) |
| 4 | NP4 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 100 % COO |
| 5 | NP5 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 100 % NH ₂ |
| 6 | NP6 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 95 % COO 5 %NH ₂ |
| 7 | NP7 | Fe ₂ O ₃ , 30-40 nm | 100 % COO |
| 8 | NP8 | SiO ₂ , 10-15 nm | 95 %PEG 5 %NH ₂ |
| 9 | NP9 | SiO ₂ , 30-40 nm | 95 %PEG 5 %NH ₂ |
| 10 | NP10 | SiO ₂ , 130 nm | 100 % COO |
| 11 | NP11 | SiO ₂ , 130 nm | 100 % PEGAcrilato |
| 12 | NP12 | Gold, 10-15 nm | 95 %PEG 5 %NH ₂ |
| 13 | NP13 | Gold, 3-8 nm | 100 % COO |
| 14 | NP14 | Gold, 10-15 nm | 100 % COO |
| 15 | NP15 | Gold, 30-40 nm | 100 % COO |
| 16 | NP16 | PSty, ~ 15 nm | 100 % COO |
| 17 | NP17 | PSty, ~ 40 nm | 100 % COO |
| 18 | NP18 | PSty, ~ 200 nm | 100 % COO |
| 19 | NP19 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 10K Dextrano |
| 20 | NP20 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 50 % PEG 50 % NH ₂ |
| 21 | NP21 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 80 % PEG 20 % NH ₂ |
| 22 | NP22 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 90 % PEG 10 % NH ₂ |
| 23 | NP23 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 40 K Dextrano |
| 24 | NP24 | Fe ₂ O ₃ , 10-15 nm | 98 % PEG 2 % NH ₂ |

Tabla 2: valores de CI₅₀ de 72 h para los compuestos activos usados en este estudio.

| Compuesto activo | DLD-1 | PA-1 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Doxorrubicina (Dox) | 1 µM | 1 µM |
| Cisplatino (Cis) | 10 µM | 0,6 uM |
| Mitoxantrona (Mito) | 40 nM | 20 nM |
| Paclitaxel (Pac) | indeterminable* | indeterminable* |
| 5-Fluorouracilo (5FU) | 10 µM | 10 µM |

*Paclitaxel era citotóxico a concentraciones tan bajas como 0,1 nM en este ensayo.

10

Tabla 3: concentraciones de compuestos activos usados para la dosificación en cada línea celular.

| Compuesto activo | DLD-1 | PA-1 |
|-----------------------|-------|-------|
| Doxorrubicina (Dox) | 1 µM | 1 µM |
| Cisplatino (Cis) | 10 µM | 2 µM |
| Mitoxantrona (Mito) | 30 nM | 30 nM |
| Paclitaxel (Pac) | 10 nM | 10 nM |
| 5-Fluorouracilo (5FU) | 10 µM | 10 µM |

Biografía

- 5 Arias et al. 2003, National Vital Statistics Reports 52:111-115
Bender et al., Cancer Research 52:121-126, 1992
Britz-Cunningham et al. Journal of Nuclear Medicine 44:1945-1961, 2003
Christiansen et al. Molecular Cancer Therapy 3:1493-1501, 2004
Dadachova et al. PNAS 101:14865-14870, 2004
10 Griffiths et al. International Journal of Cancer 81:985-992, 1999
Lawrence TS. Oncology (Huntington) 17:23-28, 2003
Liu et al. Bioconjugate Chemistry 12:7-34, 2001
Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE
Transactions on Magnetics, 1981. MAG-17(2): p. 1247-1248
Minchinton, A. 1. and Tannock, I. F., Nat. Rev. Cancer 2006, 6:583-592
15 O'Donoghue et al. Journal of Nuclear Medicine 36:1902-1909, 1995
Primeau et al. Clin. Canc. Res. 2005, 11:8782-8788
Sellers et al. Journal of Clinical Investigation 104:1655-1661, 1999
Waldmann, Science 252:1657-1662, 1991
20 Xue et al. PNAS 99:13765-13770, 2002

REIVINDICACIONES

1. Material en forma de partículas y una toxina celular para su uso en el tratamiento de un tumor sólido, en donde dicho material en forma de partículas está en forma de una dispersión en un vehículo líquido, manteniéndose el material en forma de partículas en un estado dispersado por un estabilizador; en donde el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y una parte de anclaje; en donde dicha parte de anclaje ancla el estabilizador al material en forma de partículas y es diferente del resto del estabilizador; en donde dicho segmento polimérico de estabilización estérica es soluble en dicho vehículo líquido y comprende un grupo funcional iónico terminal, particularmente en donde el grupo funcional iónico es un catión; en donde dicho material en forma de partículas varía en tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 350 nm; en donde dicho material en forma de partículas y toxina celular penetran en dicho tumor sólido; en donde dicho material en forma de partículas y toxina celular se coadministran en dos formulaciones separadas; y en donde dicha toxina celular es un agente citostático o citocida seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y 5-FU.
2. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica comprende un grupo funcional iónico terminal, en donde el grupo funcional iónico es un catión.
3. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el segmento polimérico de estabilización estérica del estabilizador comprende un polímero seleccionado entre poli(acrilamida), poli(óxido de etileno), poli(hidroxietilacrilato), poli(N-isopropilacrilamida), poli(dimetilaminoetil metacrilato), poli(vinilpirrolidona) y copolímeros de los mismos.
4. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el segmento polimérico de anclaje comprende uno o más grupos de ácido carboxílico, uno o más grupos fosfato, uno o más grupos fosfinato, uno o más grupos tiol, uno o más grupos tiocarbonyl, uno o más grupos de ácido sulfónico, grupos etoxisililo o combinaciones de los mismos.
5. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el estabilizador es un estabilizador estérico que comprende un segmento polimérico de estabilización estérica y un segmento polimérico de anclaje.
6. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que uno o los dos del estabilizador estérico y los segmentos poliméricos de anclaje comprenden el resto polimerizado de uno o más monómeros etilénicamente insaturados.
7. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el estabilizador tiene un peso molecular medio en número (mn) menor de 30.000.
8. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el material en forma de partículas se selecciona entre un metal, una aleación metálica, una sal metálica, un complejo metálico, un óxido metálico, un óxido inorgánico, un isótopo radiactivo, una partícula polimérica y combinaciones de los mismos.
9. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho material en forma de partículas se selecciona de un grupo que consiste en óxido de hierro, oro, óxido de silicio y poliestireno.
10. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho material en forma de partículas o estabilizador está acoplado a un ligando, estando dicho ligando dirigido a dicho tumor.
11. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho material en forma de partículas se administra por inyección.
12. El material en forma de partículas y toxina celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho material en forma de partículas se administra antes que la toxina celular; o en donde dichos materiales en forma de partículas y dicha toxina celular se administran simultáneamente.

FIGURA 1

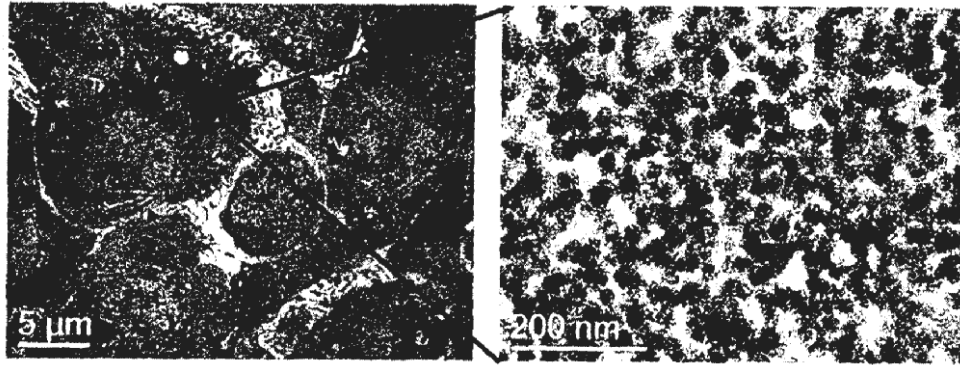


FIGURA 2

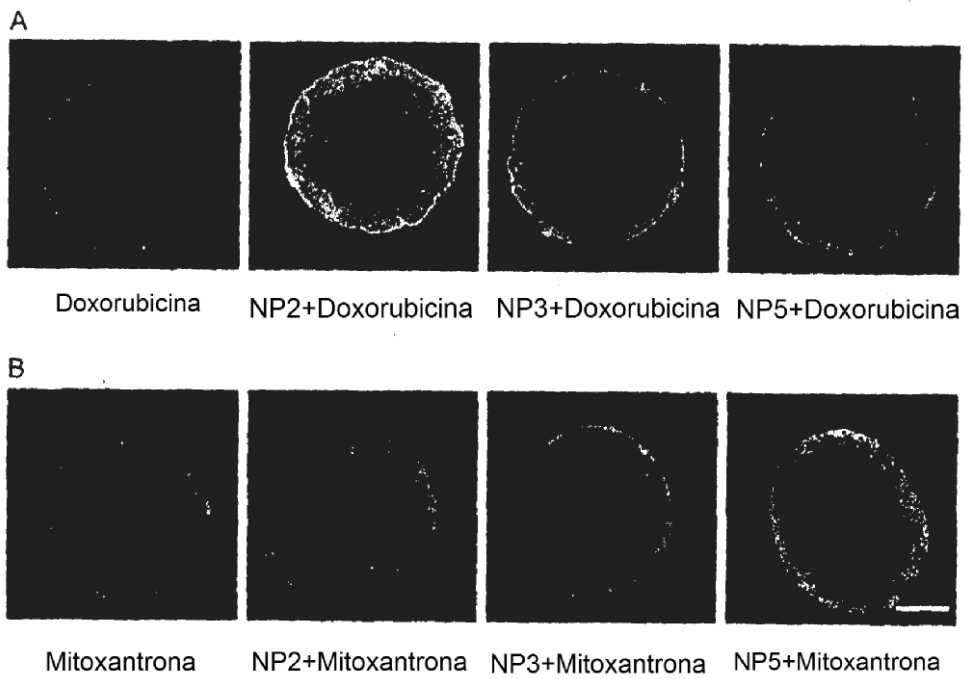


FIGURA 3

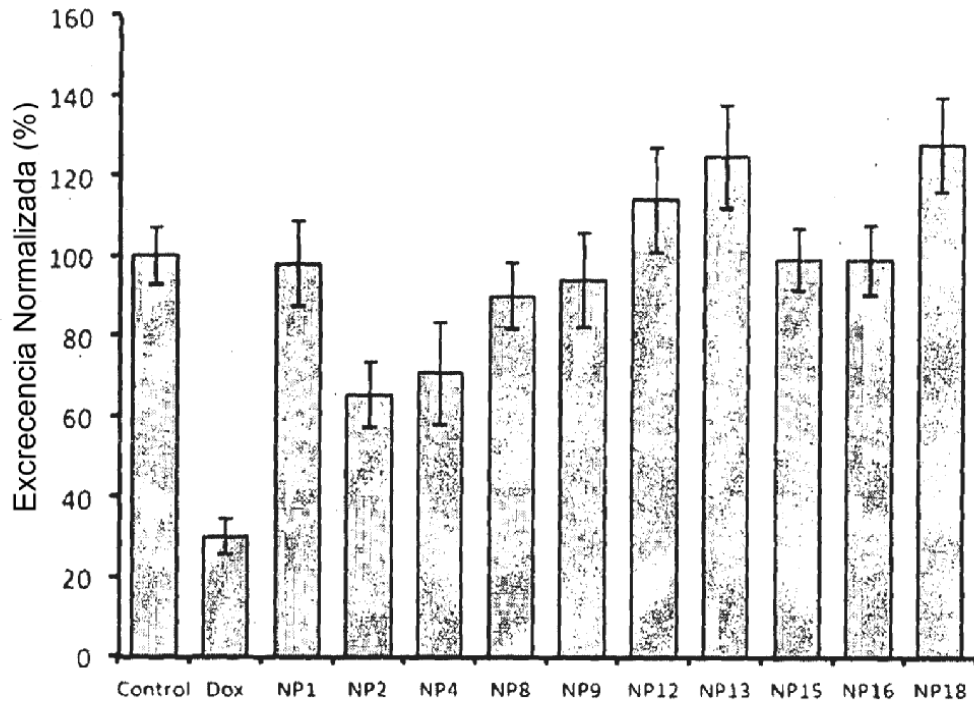


FIGURA 4

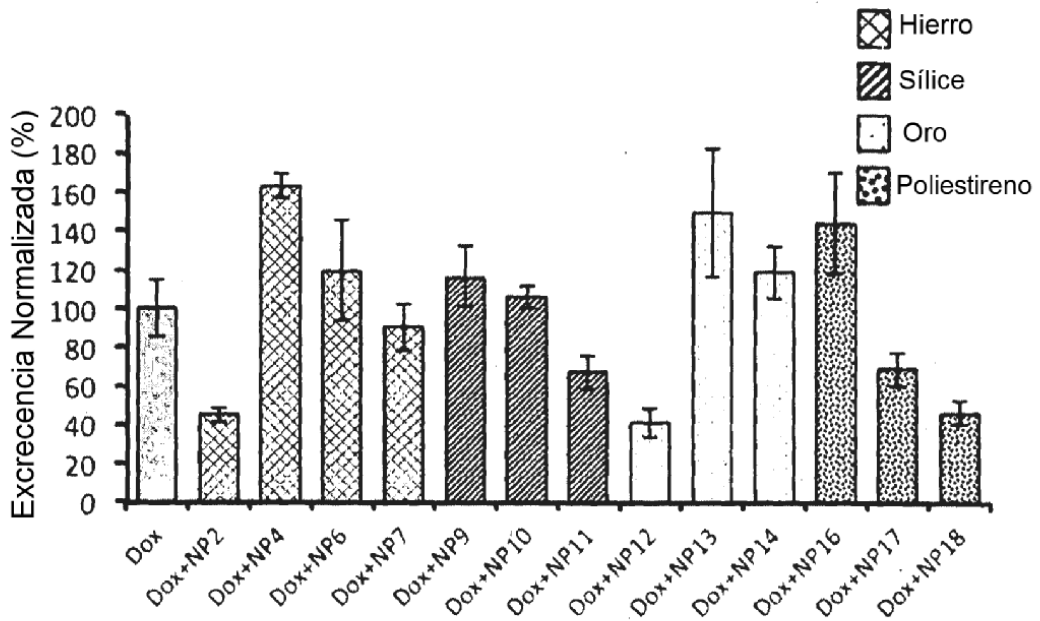


FIGURA 5

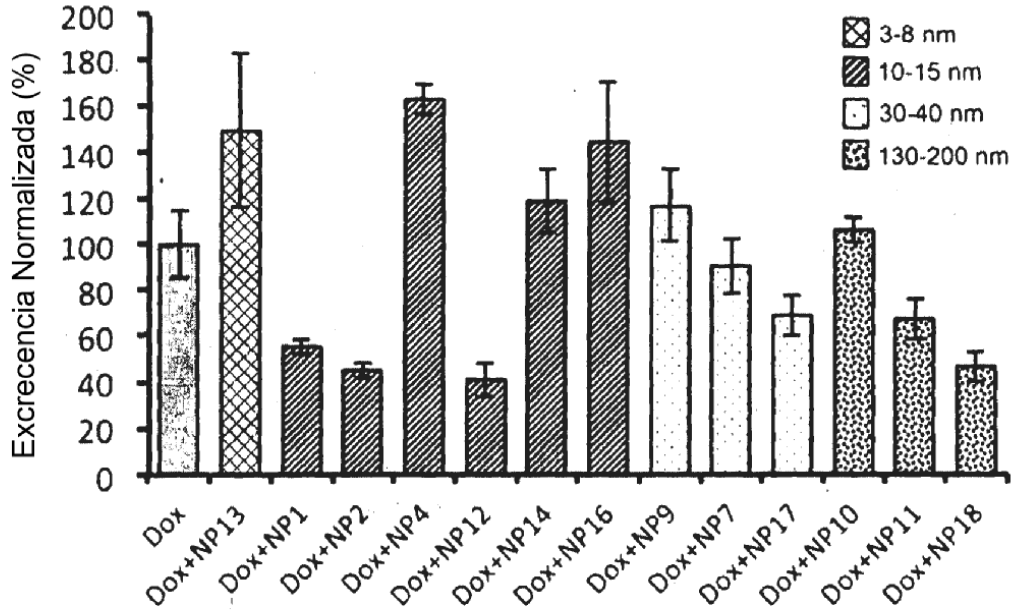


FIGURA 6

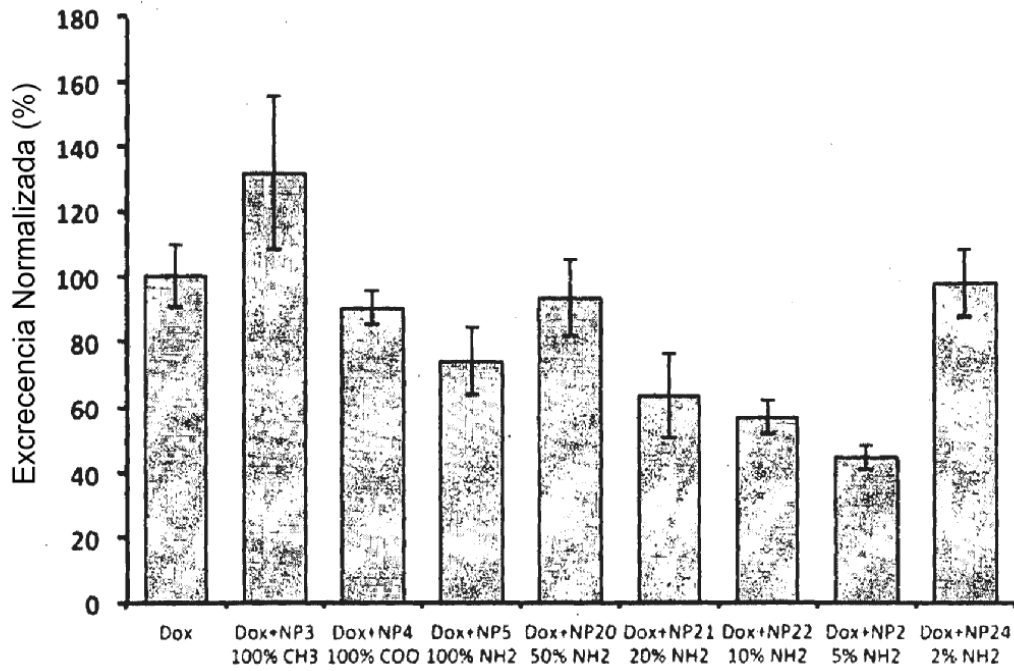


FIGURA 7

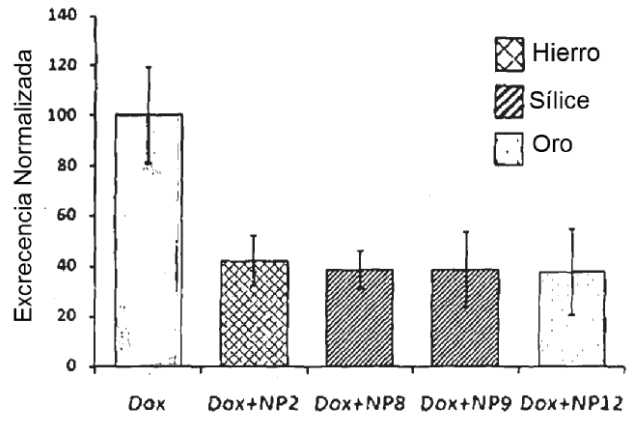


FIGURA 8

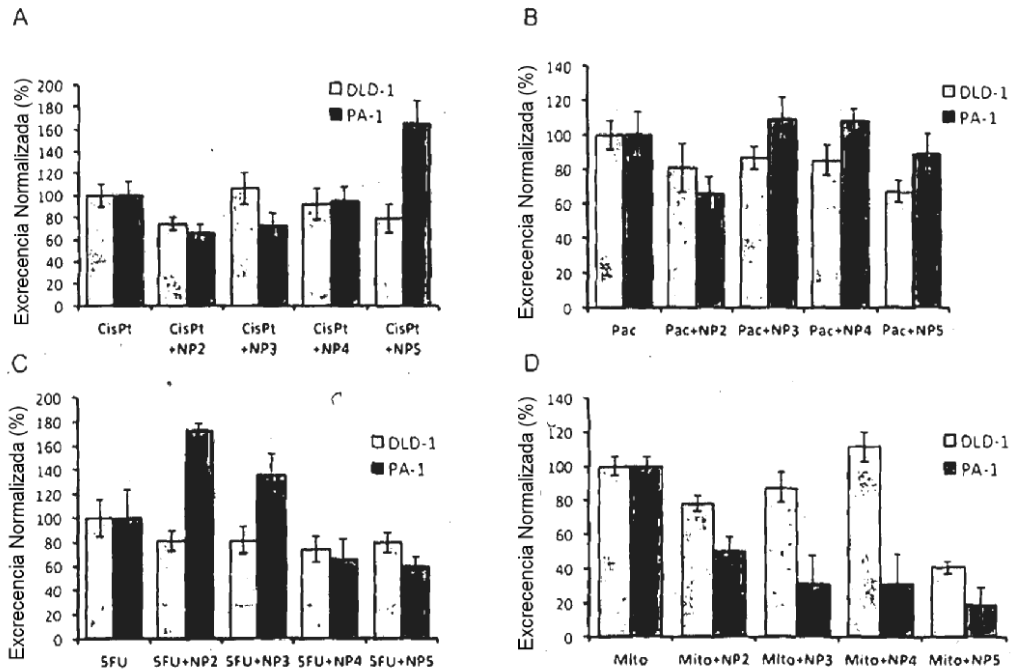


FIGURA 9

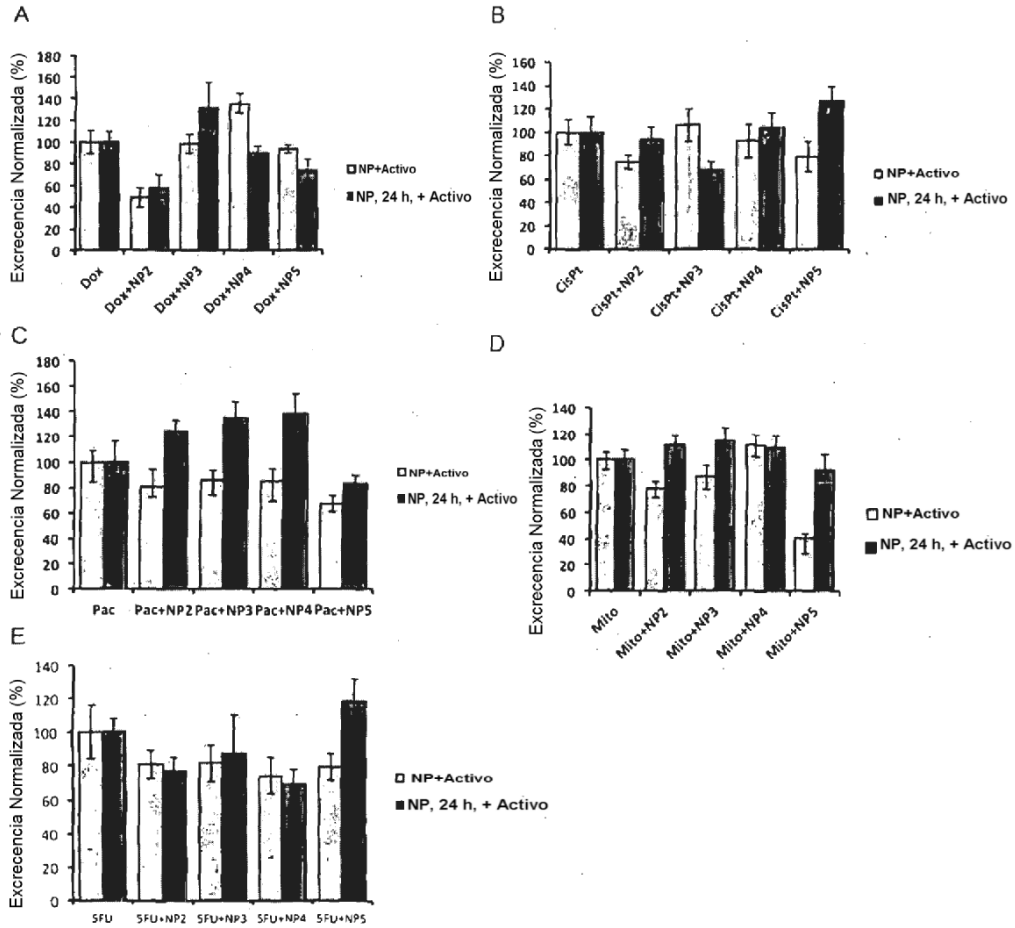


FIGURA 10

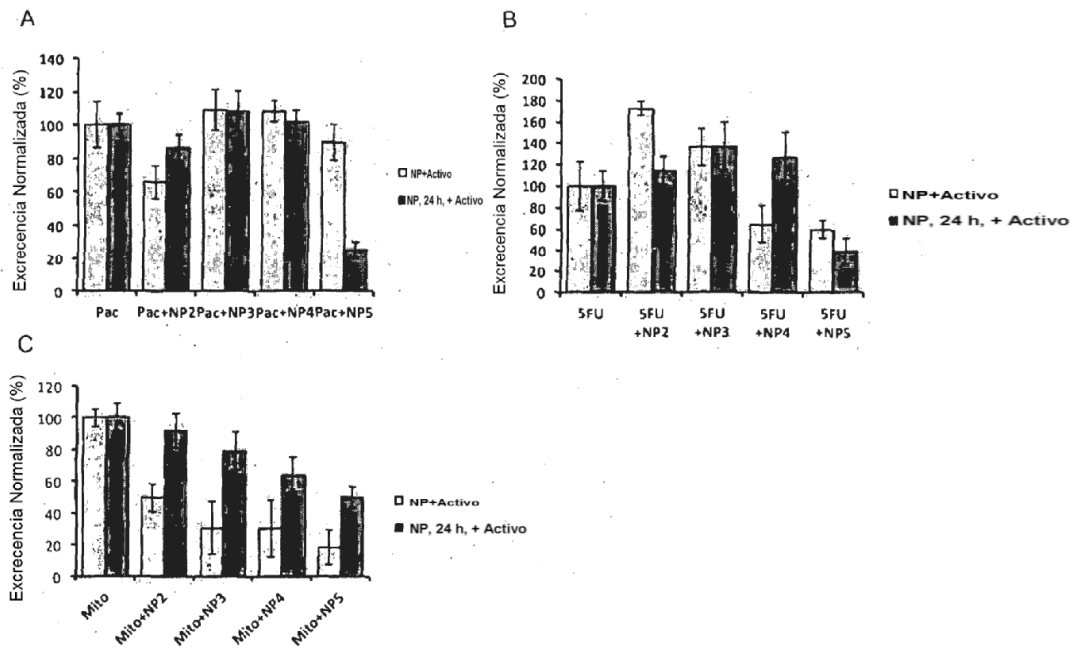


FIGURA 11

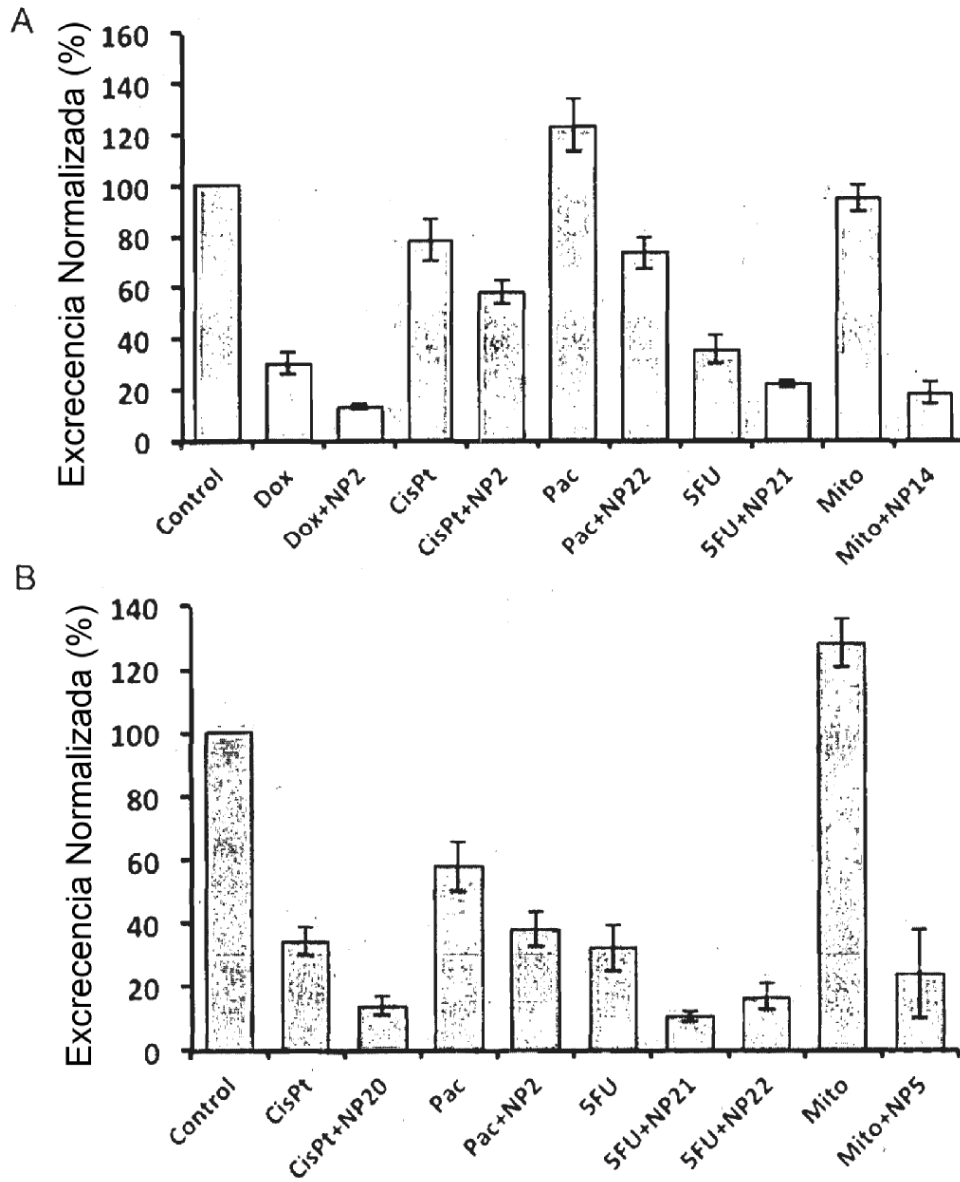
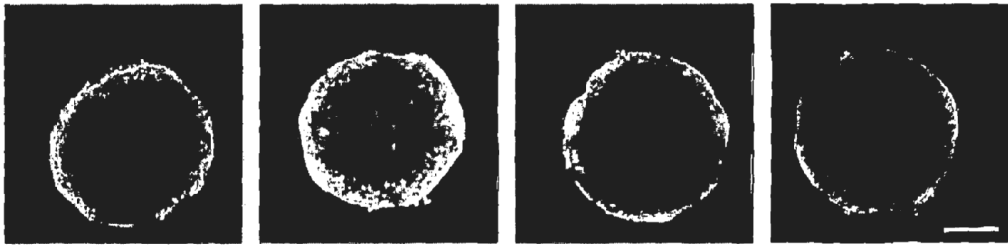


FIGURA 12



Doxorubicina

NP2 + Doxorubicina

NP19 + Doxorubicina

NP23 + Doxorubicina

FIGURA 13

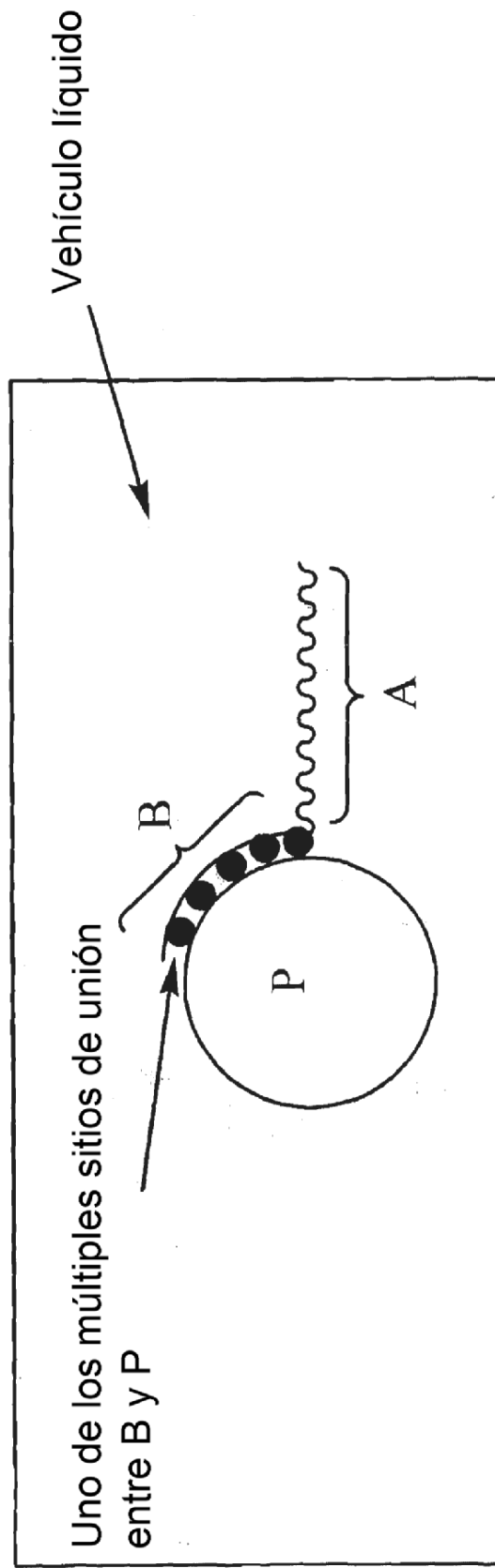


FIGURA 14

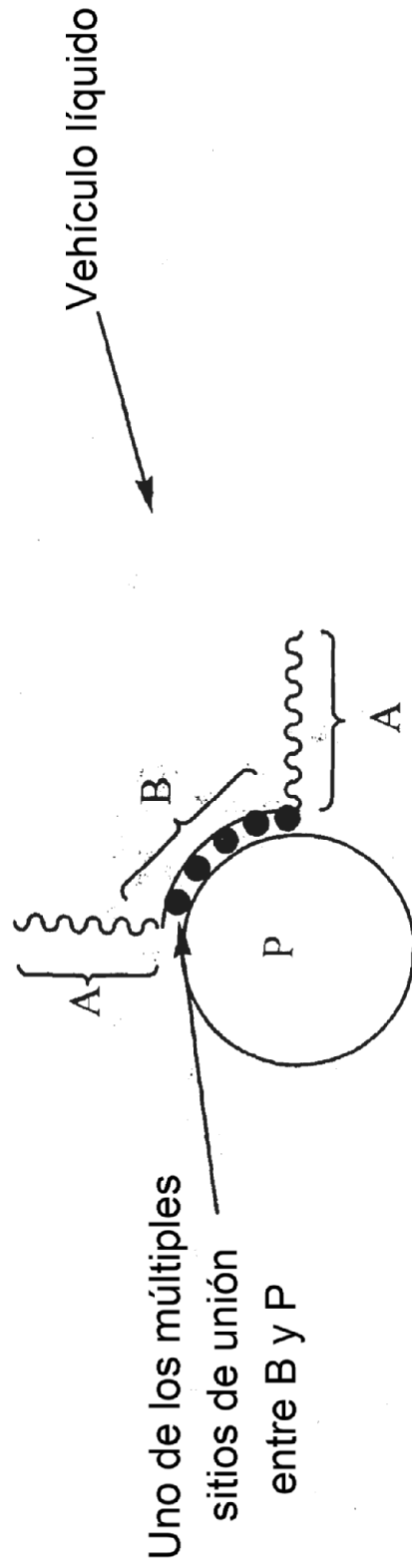


FIGURA 15

