

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 967**

51 Int. Cl.:

C01G 49/08 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01)
A61N 2/00 (2006.01)
A61B 5/055 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/IB2010/055836**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073922**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10810884 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2512992**

54 Título: **Magnetita en forma de nanopartículas**

30 Prioridad:

15.12.2009 IT FI20090258

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

73 Titular/es:

COLOROBIA ITALIA S.P.A. (100.0%)
Via Pietramarina, 53
50053 Sovigliana Vinci (Firenze), IT

72 Inventor/es:

BITOSI, MARCO;
BALDI, GIOVANNI y
INNOCENTI, FRANCO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

Observaciones:

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

ES 2 657 967 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

Magnetita en forma de nanopartículas

Campo de la invención

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de los procesos para preparar magnetita en forma de nanopartículas.

Estado de la técnica

10 [0002] La magnetita es un mineral con propiedades ferromagnéticas cuya fórmula química es Fe_3O_4 . La fórmula para la magnetita también se puede escribir $FeO \cdot Fe_2O_3$.

15 [0003] Se sabe que, cuando se sumerge la magnetita en forma de nanopartículas, es decir, con un tamaño que oscila entre unos nanómetros y unas decenas de nanómetros, en un campo magnético en la longitud de onda del radio, se calienta y después libera energía térmica en el entorno dando lugar a lo que se conoce como un efecto hipertérmico o hipertermia magnética.

20 [0004] En oncología, la hipertermia se utiliza para mejorar la eficacia de la quimioterapia o la radioterapia y, en este sentido, elevar la temperatura de un tumor sólido entre 41 y 45 °C induciendo apoptosis de células cancerosas. Para conseguir este fin, se pueden emplear nanopartículas magnéticas poniéndolas en contacto con el tumor para aprovechar su efecto hipertérmico.

25 [0005] Por lo tanto, por ejemplo, los nano híbridos biocompatibles que comprenden un núcleo de magnetita en nanopartículas y un revestimiento de polímero o proteína, posiblemente cargado con fármacos y decorado con agentes dirigidos, son potenciales agentes teranósticos en los que se combinan sinérgicamente la capacidad de desprender calor bajo el efecto de un campo EM (efecto hipertérmico), la administración del fármaco y la capacidad de detectarse durante su acción con técnicas de tratamiento de imágenes (IRM).

30 [0006] Normalmente, los valores de hipertermia se expresan como SAR (por sus siglas en inglés, tasa de absorción específica) que es un valor que depende tanto de la intensidad del campo magnético aplicado como de la frecuencia de inversión del campo de acuerdo con la ecuación:

$$SAR = K * f(d) * F * f(H_0)$$

35 en la que:

K = constante

F = frecuencia de inversión de campo

40 f(d) = función variable relacionada con el tamaño de cristalito

f(H₀) = función variable relacionada con la intensidad del campo magnético aplicado (de acuerdo con algunos autores, se aproxima a $H_0^2 \cdot H_0^3$).

45 [0007] Para ejercer un efecto hipertérmico que sea eficaz en oncología, las nanopartículas biocompatibles deben tener altos niveles de SAR: las nanopartículas biocompatibles se localizan primero en el tumor y después son excitadas por un campo magnético alterno de amplitud moderada H₀ (12-25 mT) a una frecuencia F dentro del intervalo de 100-400 kHz [P. Wust, U. Gneveckow, M. Johannsen, D. Böhmer, T. Henkel, F. Kahmann, J. Sehouli, R. Felix, J. Rieke, A. Jordan, Int. J. Hyperthermia 22, 673(2006)].

50 [0008] R. Hergt y S. Dutz en J. Magn. Magn. Mater. 311, 187 (2007) han estimado que las nanopartículas biocompatibles con una SAR superior a 1 kW/g podrían tratar tumores de 3 mm de diámetro eficazmente

55 [0009] Hasta el momento, los materiales más ampliamente estudiados en cuanto a la hipertermia magnética han sido los óxidos de hierro, dada su total biocompatibilidad y su relativa sencillez de síntesis. En la bibliografía, la magnetita más eficaz obtenida por síntesis ha presentado valores SAR de hasta 0,6 W/g a 400 kHz (R. Hergt, R. Hiergeist, I. Hilger, W. A. Kaiser, Y. Lapatnikov, S. Margel and U. Richter, J. Magn. Magn. Mater. 270, 345 (2004)).

60 [0010] Actualmente, los magnetosomas (cristales de magnetita presentes en ciertas células animales) se consideran las estructuras magnéticas más eficientes desde el punto de vista de la hipertermia para aplicaciones biomédicas (R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, D. Schüler, U. Heyen, I. Hilger, W. A. Kaiser, J. Magn. Magn. Mater., 2005, 293, 80).

[0011] La síntesis de magnetita en forma de nanopartículas está ampliamente descrita en la bibliografía y en

muchas patentes.

[0012] Los métodos utilizados pueden clasificarse en tres grupos, que son:

- 5 1) Alcalinización de soluciones (acuosas o de polialcoholes) que contienen iones Fe^{II} y Fe^{III} en una relación estequiométrica 1:2;
 2) Síntesis de tipo poliol en la que se utilizan también mezclas de Fe^{II} y Fe^{III} en una relación estequiométrica de 1:2; véase por ejemplo S. Laurent et al., Current Medicinal Chemistry, 2009, 16, 4712-4727;
 10 3) Descomposición de compuestos de hierro (inorgánicos u orgánicos) en presencia de agentes (como por ejemplo, ácido oleico) que actúan como reductores y como agentes estabilizantes.

Q. Yitai et al., Materials Research Bulletin, 1994, 29(9), 953-957 describe un proceso hidrotérmico para preparar magnetita a 130-150 °C a partir de una solución de cloruro de hierro (III) y polvo de hierro en presencia de urea. Todas las síntesis descritas presentan considerables inconvenientes cuando se evalúa su aplicación en la práctica.

- 15 1) El método de alcalinización produce partículas agregadas que forman precipitados fácilmente de un tamaño escasamente controlado y de baja hipertermia.
 2) La "síntesis de poliol" requiere un cuidadoso control de la relación estequiométrica y el uso de acetato de Fe^{II} , una materia prima que es difícil de obtener, es cara y es difícil de almacenar (al ser fuertemente higroscópica y enormemente sensible a la oxidación).
 20 3) La síntesis reductora con ácido oleico y similares tiene como resultado la formación de partículas cuya superficie se funcionaliza con grupos liófilos y por tanto insolubles en un entorno acuoso.

[0013] Las partículas obtenidas en los casos 2 y 3, sin embargo, tienen también niveles SAR bajos cuando se comparan con los valores que presentan los magnetosomas.

[0014] Por lo tanto, existe una evidente necesidad de proporcionar un proceso que permita la obtención de magnetita en forma de nanopartículas que tenga valores SAR suficientemente altos que permitan su uso para hipertermia magnética en el campo de la biomedicina.

Definiciones y abreviaturas

[0015] SAR = tasa de absorción específica

35 **[0016]** SARN = SAR normalizada con respecto a la frecuencia de inversión de campo

[0017] El término "nanopartículas" significa partículas con un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm.

40 **[0018]** Un disolvente polialcohol es un alcohol, como por ejemplo glicerol, que contiene dos o más funciones alcohol y que tiene un punto de ebullición por encima de 250 °C y un punto de fusión por encima de 0 °C.

Sumario de la invención

45 **[0019]** La presente invención resuelve los problemas mencionados por medio de un proceso de tipo poliol en el que se obtienen nanopartículas de magnetita, comprendiendo dicho proceso una etapa (ii) en la que se preparan dichas nanopartículas en un disolvente polialcohol partiendo de un ion metálico y Fe^{III} en presencia de un catalizador y una cantidad de agua en una cantidad molar equivalente a 1,5 – 5 veces más en moles la sal de Fe^{III} utilizada. El proceso de la invención permite que las nanopartículas de magnetita de tamaño uniforme y controlado presenten así una alta eficiencia hipertérmica. El proceso de acuerdo con la invención es fácil y eficiente y da cabida a evitar el uso
 50 de sales de Fe^{II} que presentan los inconvenientes que se han mencionado.

Breve descripción de las figuras

55 **[0020]** La Figura 1 presenta un gráfico en relación con las Tablas 1-5, en las que el eje de las Y indica los valores SARN y el eje de las X indica los valores de la amplitud de campo magnético aplicado.

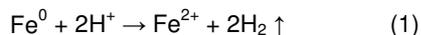
Descripción detallada de la invención

60 **[0021]** El proceso de la invención se lleva a cabo preferentemente partiendo de Fe^0 a través de las siguientes etapas:

- i) preparación de una solución de polialcohol de Fe^{III} partiendo de Fe^0 ;
 ii) preparación de tipo poliol de las nanopartículas de magnetita a través del proceso de la invención tal como se ha descrito en el que la solución obtenida en la etapa (i) se utiliza como fuente de Fe^{III} .

65 **[0022]** La etapa (i) anterior no es otra que la perfectamente conocida y exhaustivamente descrita reacción de ataque

ácido (incluso ácidos débiles como ácido acético) sobre hierro de acuerdo con la ecuación:



5 **[0023]** En la bibliografía, la reacción se describe normalmente en un entorno acuoso, pero se ha descubierto ahora que es posible llevarla a cabo en condiciones de “síntesis de poliol” al mismo tiempo que se mantiene el entorno desprovisto de oxidantes (como oxígeno atmosférico).

10 **[0024]** Posteriormente, se puede oxidar completamente en Fe^{III} la solución de Fe^{II} en polialcoholes (por ejemplo, acetato) introduciendo burbujas de aire en el medio de reacción con una temperatura inferior a 100 °C.

[0025] Por tanto, en una forma preferente, en la etapa (i) el proceso de la invención implica la preparación de una solución de polialcohol de Fe^{III} a través de las siguientes etapas:

- 15 a) preparación de una solución de Fe^{II} partiendo de Fe^0 en un disolvente polialcohol y en presencia de un ácido orgánico;
b) preparación de una solución de Fe^{III} introduciendo burbujas de aire en la solución obtenida en la etapa a), eliminado por filtración a continuación el hierro metálico residual.

20 **[0026]** Preferentemente, la etapa a) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 130 y 200 °C mientras que la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de menos de 100 °C.

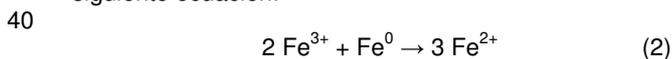
[0027] Dicho ácido orgánico se selecciona preferentemente entre ácidos que forman compuestos de Fe^{II} que son solubles en un disolvente polialcohol, en particular, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico.

25 **[0028]** Preferentemente, en la etapa a) se utiliza el ácido en una relación molar equivalente a 4-5 veces más las moles de Fe metálico.

30 **[0029]** Preferentemente, para la etapa a), se suspende Fe metálico en una cantidad en peso de polialcohol equivalente a 80 -120 veces más el peso de Fe^0 .

[0030] La etapa (ii) que se ha mencionado es la etapa en la que se calienta una mezcla de iones Fe^0 y Fe^{III} en un disolvente polialcohol en presencia de una cantidad de agua en una relación molar equivalente a 1,5 – 5 veces más las moles de la sal de Fe III utilizada y en presencia de un catalizador ácido.

35 **[0031]** Se ha descubierto que en condiciones de “síntesis de poliol” (el disolvente es un polialcohol, como por ejemplo glicerina o propilen glicol o dietilen glicol, preferentemente, a una temperatura comprendida entre 130 y 200 °C), cuando está presente un catalizador adecuado, se reduce el hierro (III) en el ion metálico de acuerdo con la siguiente ecuación:

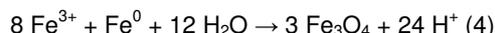


45 **[0032]** La reacción de formación de Fe^{II} se cataliza con un entorno ácido. En particular, se pueden utilizar como catalizadores ácidos minerales como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, o sales que presentan hidrólisis ácida, tales como cloruro de hierro (FeCl_3).

50 **[0033]** Dado que la cinética de una reacción redox (2) es relativamente lenta, mientras que la formación de magnetita a partir de Fe^{II} y Fe^{III} en las condiciones de temperatura seleccionadas es rápida, el hierro (II) que se forma reacciona completamente con el exceso de Fe (III) presente en forma de magnetita de acuerdo con la ecuación:



55 **[0034]** La reacción completa para la formación de magnetita se puede describir por tanto como:



60 **[0035]** De acuerdo con la invención, la magnetita en nanopartículas se puede preparar preferentemente en disolventes como glicerina, propilen glicol, dietilen glicol y polialcoholes análogos, convenientemente, a una temperatura comprendida entre 130 y 200 °C. La cantidad de agua en el disolvente es un factor clave para controlar el tamaño del radio hidrodinámico de las nanopartículas magnéticas obtenidas, medido según DLD (dispersión de luz dinámica); el tamaño de los cristallitos de magnetita se determina de hecho a partir de la concentración operativa y a partir de la concentración del agua presente en el entorno de reacción. El agua está presente en una cantidad molar equivalente a 1,5 - 5 veces más las moles de sal de Fe^{III} utilizada en la etapa (ii).

65 **[0036]** Preferentemente el Fe^0 presente en una cantidad molar equivalente a 0,2 – 1 vez más las moles de sal Fe^{III}

utilizada en la etapa (ii).

[0037] Preferentemente, para la etapa (ii) el Fe metálico está suspendido en una cantidad en peso de polialcohol equivalente a 0,5 – 4 veces más el peso de la solución de Fe^{III}.

[0038] Se advirtió también que al operar en una manera semi-continua realizando adiciones consecutivas de solución de Fe^{III} (o alternativamente acetato de Fe^{III} u otras sales soluble en un disolvente glicólico), es decir, de manera que tiene lugar la reacción de formación de magnetita en etapas consecutivas, se podrían obtener valores de eficiencia hipertérmica más altos (véase los ejemplos B3-B6: los métodos para medir el efecto hipertérmico se dan en la parte experimental). Un método equivalentemente conveniente es el control de la velocidad de adición de la solución de Fe^{III} para que la temperatura no experimente sustanciales variaciones (es decir, que permanezca estable, con un $\Delta T < 10$ °C) durante la adición (véase los ejemplos B-5 y B-6).

[0039] Preferentemente, se añade Fe^{III} en forma de una solución de polialcohol a una concentración de 2-5 % en peso.

[0040] Preferentemente, se utiliza el catalizador ácido en cantidades molares equivalentes a 0,01 - 0,1 veces más las moles de la sal de Fe^{III} utilizada en la etapa (ii).

[0041] Al final de la etapa (ii), se separa el residuo sólido (ion metálico) desde la fase líquida por filtración para obtener un producto pardo oscuro transparente (que contiene la magnetita en forma de nanopartículas) que presenta unas propiedades marcadamente magnéticas.

[0042] Los valores SAR encontrados para las nanopartículas obtenidas a través del proceso de la invención fueron, para la misma frecuencia e intensidad del campo magnético aplicado, comparables con las conocidas y notificadas en la bibliografía para magnetosomas o más altas (véase las Tablas 1-5 y la Figura 1).

[0043] Las nanopartículas de magnetita obtenidas sintéticamente con dichas propiedades de hipertermia magnética no tienen precedentes en la bibliografía; el efecto de hipertermia observado se debe a un grado específico y alto de cristalinidad en la estructura de la magnetita obtenido a través del proceso de la invención.

[0044] La magnetita obtenida a través del proceso mencionado es potencialmente útil para la preparación de composiciones teranósticas para el tratamiento hipertérmico y/o diagnóstico (por IRM) de tumores.

[0045] Para aplicaciones biomédicas, reviste una particular importancia que las nanopartículas de magnetita sean estables en un entorno fisiológico, es decir, en un entorno acuoso y en presencia de una salinidad relativamente alta. La magnetita en nanopartículas obtenida de acuerdo con la presente invención se puede hacer dispersable en agua de forma estable tratando el producto de reacción (4) con ácido fosfórico. De esta manera, se obtiene un precipitado sólido por centrifugación que (después del lavado con agua para eliminar el exceso de ácido fosfórico) se puede solubilizar fácilmente con solución de amoníaco diluida para obtener un pH final de la dispersión ligeramente alcalino. La presente invención se puede entender mejor a la luz de los siguientes ejemplos prácticos.

Parte experimental

A) Preparación de solución de acetato de hierro III

Ejemplo A-1

[0046] Se introducen los siguientes ingredientes en un matraz de 500 ml equipado con un embudo de vertido, termómetro, refrigerador y sistema para el lavado con descarga con gas:

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	150,00	>99 %
Fe metálico	1,50	99 %
Ácido acético	8,00	99 %

[0047] En primer lugar se hace fluir nitrógeno en el sistema y, a continuación (todavía bajo un gas inerte), se comienza el calentamiento, ajustando la temperatura a 150 °C. Al cabo de 12 horas, se puede advertir la desaparición casi completa del hierro de base metálica y un cambio del color en la solución.

[0048] Al mismo tiempo que se mantiene el sistema bajo nitrógeno, se reduce la temperatura a 85 °C, después de lo cual se comienza a introducir burbujas de aire. Se advierte inmediatamente un cambio de color en la solución, al adquirir un color rojo oscuro. Se mantiene el burbujeo de aire durante 2 horas y después se enfría el sistema a temperatura ambiente.

[0049] Se filtra la solución a través de un embudo Buchner para eliminar las trazas de hierro residual después de lo cual, se puede utilizar la solución en las etapas siguientes.

B) Preparación de la magnetita

5

Ejemplo B-1

[0050] Se introducen lo siguiente en un matraz de 500 ml equipado con un embudo de vertido, termómetro, refrigerador y sistema de inercia de nitrógeno:

10

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	150,00	>99 %
H ₂ O	1,50	100 %

15 [0051] Se añade lo siguiente a una temperatura de 150 °C:

Metal Fe	1,50	99 %
----------	------	------

[0052] Seguido inmediatamente de:
solución de Fe(CH₃COO)₃ en:

20

DEG	30,00	4,34 %
-----	-------	--------

[0053] La temperatura cae por debajo de 140 °C (138 °C) y después vuelve a 150 °C y se mantiene ahí durante 25 minutos. Se añade lo siguiente:

25

32% HCl	0,10	32,00%
---------	------	--------

[0054] Se lleva la temperatura a 160 °C y se mantiene ahí durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negro-parduzca con marcadas propiedades magnéticas.

30

[0055] Análisis de tamaño utilizando DLD (dispersión de luz dinámica): PDI: 0,230; promedio Z: 15,86 nm; Volumen medio 11,43 nm; Porcentaje máximo 99,9%.

35

Contenido en magnetita (ICP) :	2650 ppm
Contenido en magnetita teórico:	0,26%
hipertermia 30 s:	0,6 °C
Hipertermia específica 1 %:	2,4 °C

40

Ejemplo B-2

[0056] Se introdujo lo siguiente en un matraz de 500 ml equipado con un embudo de vertido, termómetro, refrigerador y un sistema de inercia de nitrógeno:

45

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	150,00	>99 %
H ₂ O	1,50	100 %

50 [0057] Se ajusta la T a 150 °C. Tan pronto como se alcanza esta temperatura, se añade lo siguiente:

Metal Fe	1,50	99 %
----------	------	------

[0058] Inmediatamente después, se añade lentamente y gota a gota lo siguiente asegurando que la temperatura no cae por debajo de 145 °C.
Solución Fe(CH₃COO)₃ en

55

DEG	120,00	4,34 %
-----	--------	--------

60 [0059] Se retorna la temperatura a 150 °C y se mantiene ahí durante 25 minutos. Se añadió lo siguiente:

32 % HCl	0,10	32,00 %
----------	------	---------

65 [0060] Se lleva la temperatura a 170 °C y se mantiene ahí durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negra con marcadas propiedades magnéticas.

[0061] Análisis de tamaño dinámico: PDI 0,130; Z 24.00; Volumen medio 21.29 nm; Porcentaje máximo 100 %.
 Contenido en magnetita (I.C.P.): 0,70 %
 Contenido en magnetita teórico: 0,71 % Hipertermia 30 s: 4,2 °C
 Hipertermia específica 1%: 5,9 °C

5

Ejemplo B-3

[0062] Se introduce lo siguiente en un matraz de 500 ml equipado con embudo de vertido, termómetro, refrigerador y sistema para lavado por descarga con gas:

10

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	150,00	>99 %
H ₂ O	1,50	100 %

15 **[0063]** Se ajusta la temperatura a 150°C. En cuanto se alcanza esta temperatura, se añade lo siguiente:

Metal Fe	1,50	99 %
----------	------	------

[0064] Seguido inmediatamente de:
 Solución de Fe(CH₃COO)₃ en:

20

DEG	30,00	4,34 %
-----	-------	--------

25 **[0065]** La temperatura cae por debajo de 138°C. Se retorna la temperatura a 150°C y se mantiene ahí durante 25 minutos. A continuación se añade lo siguiente:

32 % HCl	0,10	32,00 %
----------	------	---------

30

[0066] Se lleva la temperatura a 160°C y se mantiene ahí durante 30 minutos. A continuación se añade lo siguiente:
 Solución Fe(CH₃COO)₃ en

30,00	4,34 %	DEG
-------	--------	-----

35

[0067] Se retorna la temperatura a 160°C y se mantiene ahí durante 45 minutos. Se repite el procedimiento tres veces para una adición TOTAL de 120 gramos de solución. Se mantiene la suspensión a 160 °C durante 1 hora, a continuación, se deja enfriar, todavía bajo un gas inerte. Finalmente, se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negra con marcadas propiedades magnéticas.

40

[0068] Análisis de tamaño dinámico: PDI 0,074; Z 20,93; Volumen medio 18.27 nm; Porcentaje máximo 100%.
 Contenido en magnetita (I.C.P.): 0,74%
 Contenido en magnetita teórico: 0,71 % hipertermia 30 s: 8,4 °C
 Hipertermia específica 1%: 11,4 °C

45

Ejemplo B-4

[0069] Se introduce lo siguiente en un matraz de 500 ml equipado con embudo de vertido, termómetro, refrigerador y un sistema de inercia de nitrógeno:

50

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	150,00	>99 %
H ₂ O	1,50	100 %

55 **[0070]** Se ajusta la temperatura a 150°C. En cuanto se alcanza esta temperatura se añade lo siguiente:
 Solución Fe(CH₃COO)₃ en

Metal Fe	1,50	99 %
----------	------	------

60 **[0071]** Seguido inmediatamente después de:

30,00	4,34%	DEG
-------	-------	-----

65 **[0072]** La temperatura cae por debajo de 138°C. Se retorna la temperatura a 150°C y se mantiene ahí durante 25 minutos. A continuación se añade lo siguiente:

32% HCl 0,10 32,00 %

[0073] Se lleva la temperatura a 160 °C y se mantiene ahí durante 30 minutos. A continuación, se eleva la temperatura a 170 °C, manteniéndose esta última temperatura durante 30 minutos.

5

[0074] A continuación se añade lo siguiente:
solución de Fe(CH₃COO)₃ en

30,00 4,34 % DEG

10

[0075] Se retorna la temperatura a 170 °C y se mantiene ahí durante 45 minutos. Se repite el procedimiento cinco veces para una adición TOTAL de 180 gramos de solución. Se mantiene la suspensión a 170 °C durante 1 hora, a continuación, se deja enfriar, todavía bajo gas inerte.

15

[0076] Finalmente, se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negra con marcadas propiedades magnéticas.

[0077] Análisis de tamaño dinámico: PDI 0,051; Z 24.00; Volumen medio 21.29 nm; Porcentaje máximo 100 %.

Contenido en magnetita (I.C.P.): 0,86 %

20

Contenido en magnetita teórico: 0,88 %

Hipertermia 30 s: 25,8 °C

Hipertermia específica 1 %: 29,3 °C

Ejemplo B-5

25

[0078] Se introduce lo siguiente en un matraz de 1000 ml equipado con embudo de vertido, termómetro, refrigerador y un sistema de inercia de nitrógeno:

30

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	300,00	>99 %
H ₂ O	1,50	100 %
Metal Fe	3,00	100 %

[0079] Se ajusta la temperatura a 170 °C. En cuanto se alcanza esta temperatura se añade lo siguiente:

35

32% HCl 0,25 32,00%

[0080] Se mantiene esta temperatura durante 5 minutos tras lo cual se añade lo siguiente:

40

Solución Fe(CH₃COO)₃ 60,00 g

[0081] La temperatura cae como resultado de la adición, se deja que la suspensión retorne a la temperatura establecida (170 °C), a continuación, se deja con agitación a temperatura constante.

45

[0082] Al cabo de 40 minutos, se añade lo siguiente gota a gota (100 g/h)

Solución Fe(CH₃COO)₃ 480,00 g

50

y se lleva un seguimiento de la temperatura para asegurar que permanece siempre entre 168 y 172 °C. Una vez completada la adición, se vuelve a mantener el sistema a 170 °C durante 2 horas más, a continuación, se enfría a temperatura ambiente, tras lo cual se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negra con marcadas propiedades magnéticas.

[0083] Análisis de tamaño dinámico: PDI 0,030; Z 23.82; Volumen medio 21.43 nm; Porcentaje máximo 100 %.

55

Contenido en magnetita (I.C.P.): 1,07 %

Contenido en magnetita teórico: 1,04 %

Hipertermia 30 s: 31,4 °C

Hipertermia específica 1%: 29,35 °C

60

Ejemplo B-6

[0084] Se introduce lo siguiente en un matraz de 1000 ml equipado con un embudo de vertido, termómetro, refrigerador y un sistema de inercia de nitrógeno:

65

Reactivo	Cantidad (g)	Contenido
DEG	300,00	99 %

H ₂ O	1,50	100 %
Metal Fe	3,00	100 %

5 **[0085]** Se ajusta la temperatura a 170 °C. En cuanto se alcanza esta temperatura, se añade lo siguiente:

32% HCl	0,25	32,00 %
---------	------	---------

[0086] Se mantiene esta temperatura durante 5 minutos, tras lo cual se añade lo siguiente:

10 Solución Fe(CH ₃ COO) ₃	60,00 g
--	---------

[0087] La temperatura cae como resultado de la adición, se deja que la suspensión retorne a la temperatura establecida (170 °C), a continuación, se deja con agitación a temperatura constante.

15 **[0088]** Transcurridos 40 minutos, se añade lentamente y gota a gota lo siguiente (50 g/h)

Solución Fe(CH ₃ COO) ₃	540,00 g
---	----------

20 y se lleva un seguimiento de la temperatura para asegurar que siempre permanece entre 168 y 172 °C. Cuando se completa la adición, se vuelve a mantener el sistema a 170 °C durante 2 horas más, a continuación, se enfría a temperatura ambiente tras lo cual se separa la fase líquida del residuo de hierro metálico. Se obtiene una solución negra con marcadas propiedades magnéticas.

25 **[0089]** Análisis de tamaño dinámico: PDI 0,144; Z 47.78; Volumen medio 38.67 nm; Porcentaje máximo 100 %.
 Contenido en magnetita (I.C.P.): 1,07 %
 Contenido en magnetita teórico: 1,07 % Hipertermia 30 s: 58,0 °C
 Hipertermia específica 1 %: 54,20 °C

30 C) Solubilización de magnetita en agua

Ejemplo C-1

35 **[0090]** Se introducen 300 g de solución de ácido fosfórico al 2 % en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, a continuación, se añaden 100 g de la solución del ejemplo B-6 con agitación.

40 **[0091]** Se mantiene la solución con agitación durante 30 minutos, permitiendo que se decante el floculado negro que se ha formado. Se separa magnéticamente el precipitado y se lava dos veces con agua desmineralizada, manteniendo cada vez la suspensión con agitación durante 20 minutos seguido de decantación y separación magnética.

[0092] Se recoge el sólido húmedo así obtenido con 200 g de hidróxido de amonio 0,05 M y se deja con agitación durante 20 minutos. Se obtiene una solución transparente, que presenta un análisis de tamaño dinámico comparable al producto del Ejemplo B-6.

45 **[0093]** Se puede diluir el producto en tampón fosfato-amoniaco a pH 7,4-7,8

D) Medición de hipertermia 30 s y específica. Cálculo de SAR

50 **[0094]** Para medir los datos de hipertermia, los autores de la invención utilizaron el equipo de calentamiento por inducción en estado sólido de Ameritherm Inc., con el campo magnético H⁰ ajustado a 21 KA/m (kiloamperios/metro) y la frecuencia F en 17 KHz (kilohertzios).

55 **[0095]** Se tomaron las mediciones de aumento de la temperatura en el centro de un bobinado de 50 mm de diámetro en una muestra (a temperatura ambiente, aproximadamente 22 °C) de la suspensión tal como se obtuvo en los diversos ejemplos descritos.

[0096] Inmediatamente antes de la prueba, se midió la temperatura de la muestra, a continuación, se activó el aparato durante 30 segundos y se midió la temperatura final de la misma muestra (Hipertermia 30 s).

60 **[0097]** Se realizó la medición de volúmenes de muestra conocidos (0,5 ml); dado que las concentraciones de las nanopartículas magnéticas en las diferentes muestras son similares y asumiendo una dependencia lineal entre el efecto hipertérmico y la concentración, fue posible normalizar el valor obtenido a una concentración de 1 % (hipertermia específica) para obtener valores comparables.

65 **[0098]** La eficiencia hipertérmica del material (Tasa de absorción específica – SAR) se define como el calor total disipado por la muestra dividido por la masa total de la fase absorbente y el tiempo de irradiación:

$$SAR = \frac{\sum_i Q_i}{m_{Ox} \cdot \Delta t_{elevation}}$$

5 en la que i representa todas las especies implicadas en el intercambio de calor y m_{Ox} la masa total de masa absorbente (en este caso, magnetita). Dado que $Q_i = m_i \cdot C_{pi} \cdot \Delta T_i$ (m_i = masa de la especie expresada en gramos [g]; C_p = calor específico expresado en julios/gramo grados [J/g*K]), se obtuvo lo siguiente:

$$SAR = \frac{\sum_i m_i C_{pi}}{m_{\acute{O}xido}} \cdot \Delta T / \Delta t$$

10 **[0099]** Para minimizar la contribución del intercambio de calor con el entorno (dado que se opera en un entorno no controlado en cuanto a la temperatura) se aplicaron dos estrategias: para evitar cualquier intercambio de calor al comienzo de la irradiación, se acondicionaron cuidadosamente las muestras a temperatura ambiente y (determinando la curva de calentamiento de la muestra en función del tiempo) se extrapoló la pendiente de la curva en el punto cero.

15 **[0100]** Para cada muestra, se consideró por separado la contribución de nanopartículas de magnetita y de la matriz (que consiste esencialmente en dietilen glicol) cuya masa y cuya capacidad de calor específico eran conocidos (0,67 J/g*K para magnetita y 2,4 J/g*K para dietilen glicol).

20 **[0101]** El método demuestra una buena reproducibilidad con un error estimado de 5%.

[0102] Como ejemplo, la muestra del ejemplo B-4 presenta los siguientes parámetros:

25	Masa de muestra:	0,30 g
	Concentración de magnetita:	0,86%
	Masa total de dietilen glicol:	0,29742 g
	Masa total de magnetita:	0,00258 g
	Pendiente de la curva de calentamiento en el punto 0 (dT/dt):	1,293 K/s

30 **[0103]** A partir de lo cual se obtuvo lo siguiente:

35 Dietilen glicol: calor específico de masa* = 0,29742 * 2,4 = 0,713808
 Magnetita: calor específico de la masa* = 0,00258 * 0,67 = 0,001729
 Capacidad calorífica total = 0,713808 + 0,001729 = 0,715537
 Cantidad de calor absorbido = capacidad calorífica total * dT/dt = 0,715537 * 1,293
 SAR = Cantidad de calor absorbido / masa total de magnetita
 SAR = 0,715537 * 1,270 / 0,00258
 SAR = 358.6

40 E) Comparación con magnetosomas y magnetita obtenidos a través de métodos conocidos en el estado de la técnica

45 **[0104]** Dado que las mediciones SAR tomadas sobre los materiales con efecto hipertérmico se registran en diferentes campos magnéticos y valores de frecuencia y que el valor $f(H^0)$ es variable y no se puede calcular perfectamente, para comparar las SAR de los diferentes productos con el efecto hipertérmico descrito en la bibliografía, los autores de la invención han utilizado los experimentos sobre magnetosomas como referencia.

50 **[0105]** Éstas se consideran las estructuras magnéticas más eficientes desde el punto de vista de la hipertermia (véase R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, D. Schöler, U. Heyen, I. Hilger, W. A. Kaiser, J. Magn. Mater., 2005, 293, 80) y las mediciones SAR fueron tomadas en un amplio intervalo de campos magnéticos.

[0106] Para normalizar los efectos de las frecuencias utilizadas (dado que SAR es directamente proporcional a la frecuencia aplicada), los autores de la invención han definido un nuevo parámetro SARN, definido como SAR/F.

55 **[0107]** En las tablas que se adjuntan, se registran los valores SARN de magnetosomas, para magnetitas descritas en la bibliografía y para magnetitas sintetizadas por los autores de la invención.

SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
1000	410	27	2,44
800	410	17	1,95
700	410	14	1,71
400	410	8	0,98
200	410	5,5	0,49
70	410	4	0,17
8	410	2	0,02

SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
88	410	6,02	0,21
58	410	5,00	0,14
32	410	4,12	0,08

SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
78	410	6,03	0,19
40	410	4,07	0,10
20	410	3,16	0,05

SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
400	410	11,00	0,98
180	410	8,00	0,44
60	410	5,05	0,15

SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
180	410	11,00	0,98
100	410	8,00	0,44
45	410	5,03	0,15

Ejemplo	Diámetro de cristalito (nm)	SAR	F (frecuencia)	H0 (campo magnético)	SARN
B-4	11	359	170	21,00	2,11
B-6	13	643	170	21,00	3,78
B-3	16	119	170	21,00	0,70

5

10

15

[Ref. 1] R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, D. Schüler, U. Heyen, I. Hilger, W. A. Kaiser, J. Magn. Magn. Mater., 2005, 293, 80,

[Ref. 2] R. Hiergeist, W. Andrä, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter, W. Kaiser, J. Magn. Magn. Mater., 1999, 201, 420-422.

[Ref. 3] R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, G. Glöckl, W. Weitschies, L. P. Ramirez, I. Hilger, W. A. Kaiser, J. Magn. Magn. Mater., 2004, 280, 358-368.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Proceso de tipo polioliol para preparar nanopartículas de magnetita, comprendiendo dicho proceso una etapa (ii) en la que se preparan dichas nanopartículas en un disolvente polialcohol partiendo de hierro metálico y Fe^{III} en presencia de un catalizador y una cantidad de agua en una cantidad molar equivalente a 1,5 – 5 veces más las moles de la sal Fe^{III} utilizada.
- 10 **2.** Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho disolvente polialcohol se selecciona del grupo glicerina, propilen glicol y etilen glicol.
- 3.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que dicho catalizador se selecciona entre ácidos minerales.
- 15 **4.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que los precursores de dicho Fe^{III} son sales solubles en un disolvente polialcohol.
- 5.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que dicho Fe^{III} se añade a la mezcla de reacción en forma de una solución de polialcohol.
- 20 **6.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que dicho Fe^{III} se añade a la mezcla de reacción en porciones consecutivas o a una velocidad controlada, tal que la mezcla de reacción no experimenta variaciones de temperatura considerables durante la adición.
- 25 **7.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que dicho proceso va precedido de una etapa de preparación (i) de una solución de polialcohol de Fe^{III} partiendo de Fe^0 , en el que la etapa (i) comprende las siguientes etapas:
- 30 a) preparación de una solución de Fe^{II} partiendo de Fe^0 en un disolvente polialcohol y en presencia de un ácido orgánico;
 b) preparación de una solución de Fe^{III} introduciendo burbujas de aire en la solución obtenida en la etapa a),
 y en la que la solución Fe^{III} obtenida de la etapa (b) se utiliza en la etapa (ii).
- 35 **8.** Magnetita en nanopartículas de entre 1 y 100 nm de tamaño que se puede obtener a través del proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 9.** Uso de la magnetita de acuerdo con la reivindicación 8 para preparar composiciones teranósticas para tratamiento hipertérmico y/o diagnóstico (por IRM) de tumores.

40

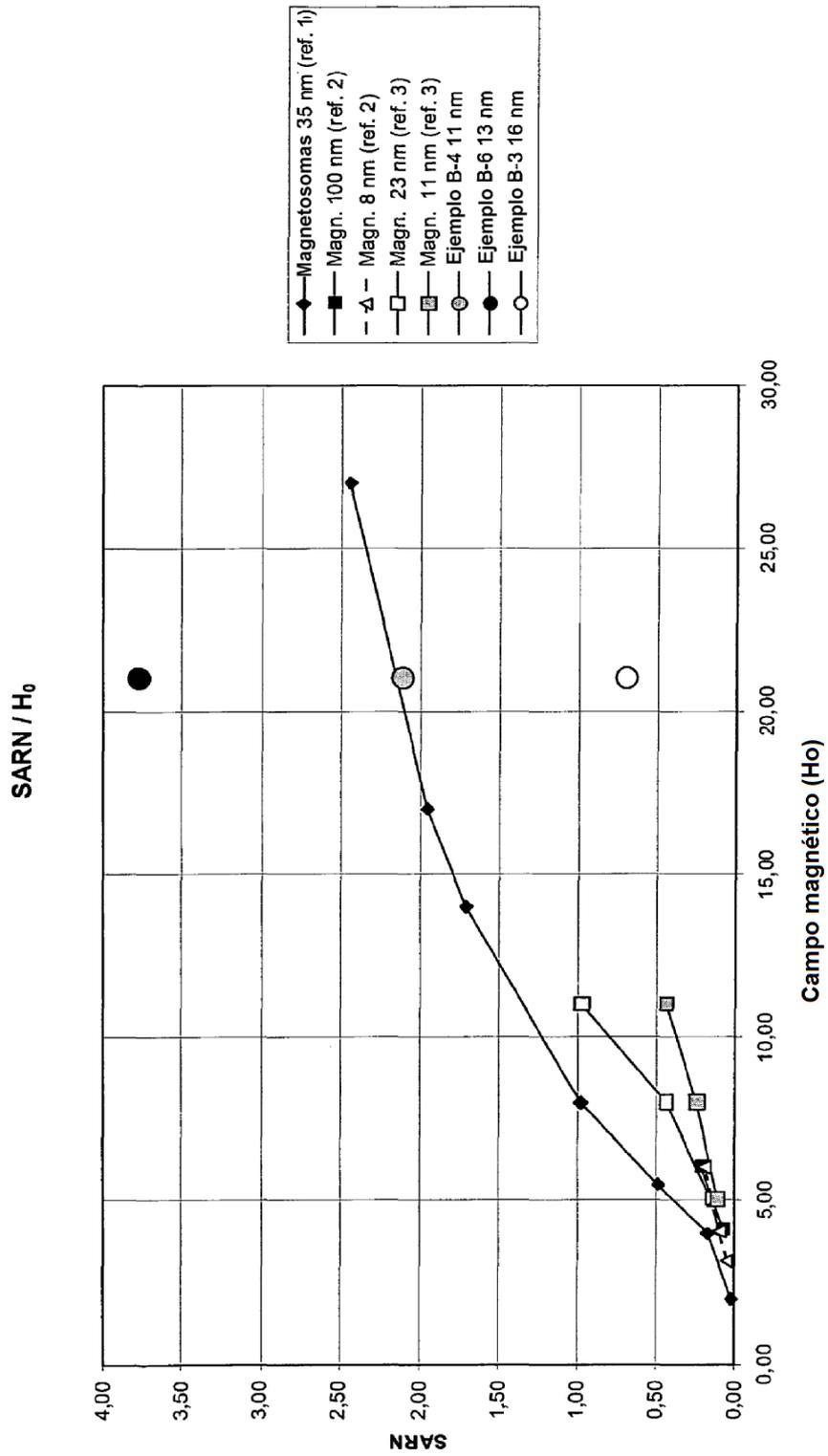


FIGURA 1