

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 962**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
B01J 2/00 (2006.01)
A61N 1/40 (2006.01)
A61N 2/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61B 5/055 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
G01R 33/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/IB2014/059337**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14132235**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14716005 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2961429**

54 Título: **Procedimiento para la producción de partículas submicrométricas y su uso terapéutico en oncología con un aparato específico**

30 Prioridad:

28.02.2013 IT TV20130027

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2018

73 Titular/es:

MBN NANOMATERIALIA SPA (100.0%)
Via G. Bortolan, 42
31050 Vascon di Carbonera, IT

72 Inventor/es:

MATTEAZZI, PAOLO;
GHERLINZONI, FILIPPO y
GOTTARDI, MICHELE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 662 962 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

Procedimiento para la producción de partículas submicrométricas y su uso terapéutico en oncología con un aparato específico.

5

Campo de la invención y preámbulo explicativo

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de partículas de tamaño submicrométrico y al uso terapéutico de las mismas en oncología, es decir una utilización en la que la detección de tumores, en particular de neoplasmas malignos, y el posterior tratamiento médico de los mismos están estrechamente asociados.

10

Tal como se observará, las partículas según la presente invención comprenden nanocristales, es decir, tal como se define por la bibliografía científica actual, aglomeraciones ordenadas de manera cristalográfica de una sustancia con dimensiones características en el intervalo normalmente de menos de 100 nm. Una aglomeración ordenada de este tipo está separada de otros nanocristales por límites de grano, concretamente puede consistir en una única partícula. Los nanocristales también pueden adoptar la forma de agrupaciones de un determinado número de nanocristales para formar partículas de mayor tamaño.

15

Estado de la técnica

20

El procedimiento terapéutico más extendido utilizado para neoplasmas malignos es la quimioterapia en la que se emplean fármacos. Sin embargo, en el caso de los tipos de neoplasmas localizados en los denominados "sitios santuario" tales como el sistema nervioso central (SNC) y los testículos, la penetración de fármacos antineoplásicos se ve dificultada por la presencia de la barrera hematoencefálica o la barrera hematotesticular (denominadas a continuación en la presente memoria BBB y BTB, respectivamente).

25

La estrategia utilizada actualmente para superar el obstáculo planteado por la BBB y BTB consiste esencialmente en utilizar dosis superiores a la máxima de dichos fármacos, pero esto da lugar a un alto riesgo de efectos secundarios inmediatos en los pacientes, tales como una reducción intensa y prolongada de la función medular (con un alto riesgo consecuente de hemorragia o infección), o efectos secundarios retrasados, tales como disfunciones cognitivas, cardíacas o gonadales con reducción de la fecundidad.

30

La radioterapia, concretamente la utilización de radiación ionizante, es otro procedimiento bien establecido, que se utiliza con frecuencia en sinergia con la quimioterapia, para inducir la necrosis de masas neoplásicas. Sin embargo, una parte de los tejidos sanos del paciente (que no obstante es cada vez menor con mejoras en el procedimiento y los equipos para implementarlo) está expuesta a la radiación, con los efectos secundarios bien conocidos.

35

En oncología con fines terapéuticos, durante los últimos años, se ha centrado una atención considerable en un procedimiento denominado hipertermia magnética basado en obtener el calentamiento localizado de las células tumorales que en particular son menos resistentes al calor que las células sanas. El procedimiento prevé la introducción, generalmente en las propias células tumorales, de partículas que consisten por lo menos parcialmente en materiales aptos para calentarse posteriormente de manera inductiva por medio de la aplicación de un campo electromagnético externo.

40

45

En este campo, una patente fundamental es la patente US nº 4.106.488 que prevé administrar a pacientes afectados por neoplasmas malignos, partículas ferromagnéticas, diamagnéticas y paramagnéticas para las cuales las células tumorales presentan una mayor afinidad que las células sanas. Las partículas magnéticas, que están encapsuladas en materiales que pueden retirarse tras un tiempo predeterminado y se mantienen suspendidas en soluciones fisiológicas adecuadas, se introducen *in vivo* y se transportan hacia los neoplasmas dado que se han combinado anteriormente con radioisótopos. Al final de un periodo de 12 horas tras la administración, la aplicación de un campo electromagnético externo de intensidad adecuada da como resultado el sobrecalentamiento de las partículas magnéticas como resultado de las corrientes inductivas, lo que provoca la fusión de los materiales de encapsulación y aumenta la temperatura de las células tumorales hasta valores tales que se destruyen.

50

55

Además de los inconvenientes debidos a la utilización de radioisótopos y la necesidad de eliminación de los materiales de encapsulación del cuerpo del paciente, es necesario mencionar también la cantidad de tiempo que transcurre entre la administración de las partículas magnéticas y el calentamiento de las mismas, concretamente cuando las células tumorales se destruyen realmente. En cualquier caso, debe observarse que esta patente no proporciona enseñanzas referentes a los procedimientos para la producción y selección de las partículas magnéticas, que en vez de eso se comentan en documentos más recientes.

60

Entre estos últimos, la patente US nº 5.441.746 describe un procedimiento complejo para producir partículas que presentan un núcleo magnético, por ejemplo de ferrita, que comprende inicialmente la adición en el estado

65

líquido de álcalis a hidróxidos de metales bivalentes y trivalentes, seguido por una etapa de mezclado para obtener geles metálicos amorfos que presentan un diámetro del orden de 100 nm y finalmente una etapa de calentamiento realizada en presencia de oxígeno con el fin de deshidratar el gel y controlar las dimensiones de los óxidos de metales cristalinos resultantes. Además del núcleo magnético, las partículas comprenden un revestimiento doble que no sólo aumenta la absorción de las ondas electromagnéticas externas por el núcleo, y por tanto el sobrecalentamiento del mismo, sino que también permite que las partículas pasen a través de membranas fisiológicas específicas que en el organismo protegen determinados tipos de células.

La patente US nº 7.122.030 se refiere a un procedimiento terapéutico para el tratamiento de neoplasmas malignos por medio de hipertermia, en el que se utilizan partículas ferroeléctricas, concretamente partículas dieléctricas cristalinas que pueden recibir una polarización eléctrica permanente de un campo eléctrico variable. Las partículas ferroeléctricas están provistas de una capa de revestimiento, por ejemplo, un polímero biocompatible y biodegradable, de modo que adoptan dimensiones también de naturaleza significativa (hasta 15 μ m) y pueden alcanzar células tumorales situadas también en profundidad dentro del cuerpo del paciente. El procedimiento se lleva a cabo con la orientación de un sistema de control que comprende la medición de la temperatura de las partículas y los parámetros del campo eléctrico variable de modo que las células tumorales alcanzan una temperatura (con un intervalo de variación comprendido entre 41,5 y 50°C) que da como resultado su destrucción, mientras que las células sanas no se dañan. La patente no proporciona ninguna enseñanza en cuanto al procedimiento para producir las partículas ferroeléctricas, en particular su revestimiento.

Además de las observaciones anteriores con respecto a patentes individuales, puede deducirse lo siguiente a partir de un examen de una sección representativa amplia y variada de la técnica anterior sobre el asunto de la hipertermia magnética:

- a) los procedimientos para obtener partículas que están listas para utilizarse muy probablemente no son aptos para la producción a escala industrial dado que son particularmente complejos y/o implican tiempos de proceso particularmente largos: por ejemplo, con el fin de obtener los núcleos magnéticos solos, sin tener en cuenta las etapas posteriores en las que se recubren y/o funcionalizan, se han propuesto etapas de producción tales como síntesis por medio de descomposición térmica de compuestos organometálicos en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición y procedimientos para la síntesis hidrotérmica con una duración de hasta 72 horas;
- b) la ejecución global del procedimiento con fines terapéuticos prevé que el paciente debe someterse a numerosas etapas (administración de las partículas, visualización de su llegada a los neoplasmas que van a tratarse, calentamiento por inducción de las partículas magnéticas) que se realizan en diferentes ubicaciones y en diferentes momentos en el tiempo, con un aumento en los costes para la estructura de atención sanitaria y mayores demandas, si no molestias, para el paciente.

La técnica anterior incluye también incluye los siguientes documentos, cuyo autor es uno de los presentes inventores y cuyo contenido se menciona de manera íntegra en la presente memoria como fuente de referencia: P. MATTEAZZI, Reduction of haematite with carbon by room temperature ball milling, en Materials Science and Engineering, A149 (1991), que demuestra la viabilidad de nanocristales magnéticos en un molino de alta energía y la solicitud de patente WO2012/085782 referente a un reactor mecanoquímico con un alto rendimiento también desde un punto de vista técnico/económico. OREL V E ET AL, DOPOVIDI NACIONALNOI AKADEMII NAUK UKRAINI n.º 8, 1 de enero de 2010 (01-01-2010), páginas 208-211, divulga el análisis de la influencia de un complejo magnetosensible sintetizado de manera mecano y magnetoquímica basándose en nanopartículas de Fe₃O₄, doxorubicina e irradiación electromagnética sobre animales con carcinoma de Guerin. Se indica que, según la bibliografía científica (por ejemplo el artículo anteriormente mencionado), se entiende que “tratamiento mecanoquímico” significa las transformaciones producidas por el impacto de masas (cuerpos de molienda) que presentan una alta energía cinética por unidad de material homogéneo o heterogéneo (volumen, peso) expuesto a impacto. Estas transformaciones mecanoquímicas implican efectos tales como variaciones en el estado de mezclado, estructura y tamaño de los cristales, distribución de las fases, estado de agregación o estado de combinación química de los elementos y compuestos presentes.

Objetivo de la invención

Por tanto, el objetivo de la presente invención es superar las limitaciones y/o inconvenientes de lo que se ha divulgado hasta ahora con respecto a la hipertermia magnética proponiendo un procedimiento terapéutico que permita el tratamiento de todos los tipos de neoplasma maligno, incluso neoplasmas localizados en “sitios santuario” tales como el sistema nervioso central y los testículos, y que pueda sustituir a la quimioterapia y a otros procedimientos de tratamiento establecidos en oncología, o por lo menos reducir la utilización de los mismos, esencialmente:

- utilizando partículas submicrométricas producidas utilizando procedimientos y aparatos de eficiencia tecnológica y económica demostrada y utilizando sustancias que, por lo menos en formas de realización preferidas de la invención, están comúnmente disponibles;

- realizando una teranóstica de los neoplasmas malignos por medio de una combinación material y temporal de diagnóstico y tratamiento utilizando un aparato, que es novedoso pero que se basa en sistemas ya bien conocidos, permitiendo la reducción de costes de inversión y funcionamiento que afectan a las estructuras de atención sanitaria así como las demandas y molestias para pacientes.

Objeto de la invención

Con el fin de alcanzar este objetivo y otros objetivos, un primer objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para producir partículas con dimensiones submicrométricas para su utilización oncológica *in vivo* según la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes:

A. tratamiento mecanoquímico de materiales magnéticos en polvo, homogéneos o heterogéneos, en una atmósfera controlada y, cuando sea apropiado, en presencia de una fase líquida de no más del 5% en volumen, hasta que se obtiene una masa consistente que comprende por lo menos el 80% en volumen de agregados de nanocristales magnéticos. Los agregados presentan principalmente dimensiones inferiores a 500 nm y están formados por unos nanocristales principalmente con dimensiones inferiores a 100 nm.

B. dispersión de dichos agregados en un fluido biocompatible;

C. selección y distribución dimensional de los agregados de nanocristales dependiendo de su temperatura de Curie dentro de un intervalo de variación predefinido. (Debería recordarse que la temperatura de Curie es la temperatura para la transición del estado ferromagnético al estado paramagnético y esta temperaturas depende de las dimensiones del cristal). Se selecciona cuidadosamente con el fin de limitar la temperatura de calentamiento máxima de las partículas magnéticas para provocar la destrucción de las células tumorales, dejando las zonas circundantes del tejido sano sin dañar;

D. funcionalización de los agregados de nanocristales magnéticos obtenidos durante la etapa C para obtener un revestimiento de los mismos que comprende moléculas de uno o más de los siguientes tipos de sustancias: sustancias para las cuales las células tumorales presentan una avidéz metabólica particular; sustancias que presentan una afinidad bioquímica con las células tumorales; sustancias que presentan una afinidad con el microentorno ácido que rodea a las células neoplásicas. Según el efecto de Warburg (descubierto en 1923 por O.H. Warburg, ganador del premio Nobel en 1931), las células tumorales presentan una alta avidéz por hidratos de carbono de monosacáridos tales como glucosa y producen un pH extracelular que es más ácido que los tejidos sanos.

En una forma de realización preferida, el tratamiento mecanoquímico de la etapa A se realiza cargando los materiales en polvo en un molino de alta energía o alternativamente en un reactor mecanoquímico tal como el descrito en la solicitud de patente WO 2012/085782 que, tal como se mencionó anteriormente, se incorpora íntegramente en la presente memoria como referencia.

En una forma de realización adicional preferida de la presente invención, con el fin de lograr la funcionalización para la avidéz metabólica en la etapa D, las moléculas de revestimiento anteriormente mencionadas son hidratos de carbono de monosacáridos, preferiblemente glucosa, provistos en un primer extremo (extremo distal) de unos separadores que presentan una forma sustancialmente lineal. El segundo extremo (extremo proximal) de los separadores está provisto de un grupo que presenta una alta afinidad frente a los nanocristales (por ejemplo, elegido de carboxilatos, fosfonatos o fosfatos). Dicho de otro modo, las moléculas anteriormente mencionadas, por ejemplo glucosa, forman la parte más exterior del revestimiento de los agregados de nanocristales magnéticos.

Un segundo objeto de la presente invención consiste en las partículas submicrométricas producidas utilizando este procedimiento y que pueden emplearse en el tratamiento de cualquier tipo de neoplasma maligno, incluyendo neoplasmas localizados en "sitios santuario", tales como el sistema nervioso central y los testículos.

Un tercer objeto de la presente divulgación es una utilización oncológica *in vivo* de dichas partículas submicrométricas; este tipo de utilización se denomina comúnmente en la actualidad teranóstica ya que, durante la misma, se realizan el diagnóstico (y por tanto también la monitorización) y el tratamiento de los neoplasmas malignos inmediatamente uno después de otro, es decir sin interrupción. Dicha utilización se realiza según la siguiente secuencia de etapas:

A. por medio de una disolución biológicamente compatible la introducción, por vía intravenosa, en el cuerpo del paciente, de partículas submicrométricas que comprenden agregados de nanocristales magnéticos funcionalizados con un revestimiento adecuado. Los nanocristales se seleccionan de modo que su temperatura de Curie está dentro de un intervalo de variación predeterminado. El revestimiento de las partículas submicrométricas comprende moléculas de uno o más de los siguientes tipos de sustancias: sustancias para las cuales las células tumorales presentan una avidéz metabólica particular; sustancias que

presentan una afinidad bioquímica con dichas células; sustancias que presentan una afinidad química con la acidez prevalente del microentorno tumoral;

5 B. la localización de las células tumorales por medio de un sistema de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) que utiliza el efecto de seguimiento de los nanocristales magnéticos. De hecho, estos últimos, debido a la atracción mutua entre células tumorales (y el microentorno tumoral) y las moléculas de revestimiento de las partículas submicrométricas, se aglomeran (es decir, se concentran de una manera sustancialmente significativa) en los tejidos tumorales, concretamente no sólo dentro de las células tumorales sino también en contacto con las mismas y en cualquier caso en la proximidad inmediata de las mismas, por ejemplo en la región de la BBB y la BTB. Por tanto, durante esta etapa B, gracias a la presente invención, pueden diagnosticarse y monitorizarse los neoplasmas con extremada precisión;

15 C. la aplicación al cuerpo del paciente, inmediatamente tras, es decir sin interrupción después de, la etapa anterior B, de un campo electromagnético variable, externo, con una intensidad y frecuencia predeterminadas. El campo se ubica en las masas tumorales definidas en la etapa B. Según una forma de realización preferida de la presente invención, el campo electromagnético se genera por medios conocidos en sí mismos que añaden a la máquina, también conocida en sí misma, del sistema de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), con la que se realiza la etapa anterior B de este procedimiento;

20 D. el campo electromagnético genera en los nanocristales magnéticos las corrientes inductivas que provocan el sobrecalentamiento de los mismos y por tanto el calentamiento de los nanocristales magnéticos concentrados en la región de las células tumorales con temperaturas limitadas por el intervalo de temperatura de Curie. Según la presente invención, esta etapa se realiza de una manera muy precisa por medio de la detección de la atenuación de la respuesta que se proporciona por el indicador y que corresponde al hecho de que los nanocristales magnéticos alcanzan las temperaturas de Curie con la consiguiente necrosis de las células tumorales. En cuanto la temperatura de los nanocristales magnéticos supera el valor máximo ($T_{m\acute{a}x}$) del intervalo de variación predefinido de la temperatura de Curie, se interrumpe la generación del campo electromagnético, previniendo el daño al tejido sano circundante en el que, tal como ya se mencionó, los nanocristales magnéticos están presentes en una concentración significativamente menor.

30 Un último objeto de la presente invención es un aparato apto para la utilización descrita anteriormente, para implementar este procedimiento.

35 Lo anterior revela dos clases de ventajas aportadas por la presente invención que proporciona claramente un enfoque terapéutico eficaz. La primera ventaja es que la postura del paciente permanece inalterada de principio a fin, evidentemente con menos molestias. La segunda, que favorece al centro de atención sanitaria en el que se adopta este enfoque, consiste en: menor costes de inversión para la maquinaria utilizada en el departamento de oncología, junto con un menor espacio ocupado; reducción en la cantidad de tiempo que pasa el paciente en la estructura de atención sanitaria.

40 **Formas de realización de la invención**

45 A continuación, en la presente memoria se describen en detalle varias formas de realización preferidas con el fin de destacar mejor los rasgos característicos y las ventajas de la presente invención en comparación con la técnica anterior. Sin embargo, se entiende que pueden proporcionarse y realizarse otras formas de realización de la misma y/o pueden desarrollarse variantes dentro del alcance de protección definido en las reivindicaciones a continuación.

50 En primer lugar, a continuación se describen las tres etapas principales del procedimiento para la producción de partículas submicrométricas para utilización oncológica con la ayuda de varios ejemplos.

Etapa A - Tratamiento mecanoquímico de materiales en polvo

55 Según experimentos llevados a cabo con la segunda forma de realización del reactor mecanoquímico descrito en la solicitud de patente ya mencionada WO 2012/085782 se ha demostrado la viabilidad de los siguientes tratamientos.

Conversión directa

60 Se tratan, concretamente se trituran, materiales magnéticos que consisten en polvos de óxido (por ejemplo óxidos de hierro) o carburos (por ejemplo carburos de hierro), compuestos intermetálicos u otros compuestos o aleaciones magnéticas, en el estado sólido en una atmósfera neutra y sin adición de calor. La duración del tratamiento es el tiempo necesario para obtener una masa que consiste principalmente (por lo menos el 80% en volumen) en agregados con dimensiones inferiores a 500 nm, estando los agregados a su vez formados por unos nanocristales magnéticos, cuyas dimensiones son inferiores a 100 nm y normalmente incluidas dentro del intervalo de 10-50 nm. En determinadas circunstancias, con el fin de obtener el resultado deseado, puede

requerirse introducir también en el molino agentes de proceso adecuados (tal como alcoholes, estearatos, hidrocarburos, agua, aunque cualquier fase líquida presente durante el tratamiento no es superior al 5% en volumen) o integrar el producto molido en el reactor con un tratamiento de disgregación convencional por medio de ultrasonidos o similares.

5

Síntesis mecanoquímica

Se trata hierro en forma de polvo (elemento puro), concretamente se tritura, en el estado sólido y sin adición de calor dentro de un reactor mecanoquímico en el que se mantiene una atmósfera con un contenido de oxígeno ajustable durante el tiempo necesario para obtener la reacción $\text{Fe} + \text{O} \rightarrow \text{FeO}_x$, concretamente para obtener óxidos magnéticos bivalentes o trivalentes dependiendo del contenido de oxígeno dentro del reactor. La duración del tratamiento es el tiempo necesario para obtener una masa que consiste principalmente (por lo menos el 80% en volumen) en agregados con dimensiones inferiores a 500 nm, estando los agregados formados a su vez por nanocristales magnéticos, cuyas dimensiones son inferiores a 100 nm y normalmente dentro del intervalo de 10-50 nm. De la misma manera puede producirse una gran variedad de compuestos y aleaciones magnéticas de hierro u otros metales.

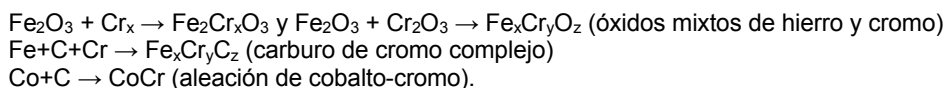
10

15

Síntesis y transformación mecanoquímica

Pueden obtenerse materiales magnéticos en polvo que consisten en óxidos (por ejemplo óxidos de hierro) o carburos (por ejemplo carburos de hierro), compuestos intermetálicos u otros compuestos o aleaciones metálicas en formas, también de naturaleza mixta, con una combinación de los tratamientos descritos anteriormente para obtener sistemas magnéticos que también pueden ser de naturaleza compleja. En un reactor mecanoquímico se obtiene una transformación tal como las indicadas a continuación a modo de ejemplo:

20



En este caso, la duración del tratamiento también es el tiempo necesario para obtener una masa que consiste principalmente (por lo menos el 80% en volumen) en agregados con dimensiones inferiores a 500 nm, estando los agregados formados a su vez por nanocristales magnéticos, cuyas dimensiones son principalmente inferiores a 100 nm y normalmente incluidas dentro del intervalo de 10-50 nm.

Etapas C – Selección magnética de los nanocristales

Con los fines de la utilización oncológica prevista de las partículas, es de importancia fundamental seleccionar una categoría dimensional de los nanocristales correspondiente a una temperatura de Curie correcta, concretamente una temperatura que pueda inducir la necrosis de las células tumorales sin dañar las células sanas. Con este fin es preferible que la temperatura de Curie de los nanocristales magnéticos deba estar en un intervalo que presente un valor mínimo $T_{\text{mín}} = 38^\circ\text{C}$ y un valor máximo $T_{\text{máx}} = 42^\circ\text{C}$.

35

Los agregados obtenidos por ejemplo según uno de los ejemplos anteriormente mencionados se dispersan en una fase líquida para obtener una dispersión de agregados de nanocristales (etapa B). Evidentemente, debe utilizarse una fase líquida biocompatible, por ejemplo una disolución acuosa, concretamente una tal como para no provocar ninguna modificación de la composición química de los nanocristales y no alterar sus propiedades magnéticas.

40

Con el fin de seleccionar, para los fines de la utilización oncológica prevista, todos, y únicamente, los agregados de nanocristales magnéticos que presentan una temperatura de Curie dentro del intervalo deseado, según la presente invención se adopta el siguiente procedimiento. En primer lugar, se lleva la disolución hasta la temperatura $T_{\text{máx}}$ que se mantiene controlada de manera termostática mientras, por medio de un primer filtro magnético sumergido en la disolución, se retiran de la misma todos los nanocristales magnéticos que presentan una temperatura de Curie superior a dicho valor $T_{\text{máx}}$. Después se reduce la temperatura de la disolución hasta la temperatura $T_{\text{mín}}$ que se mantiene con control termostático mientras, con la ayuda de un segundo filtro magnético, se extraen los agregados de nanocristales con una temperatura de Curie dentro del intervalo $T_{\text{mín}} \div T_{\text{máx}}$ para la utilización oncológica posterior.

45

50

55

Etapas D – Funcionalización de los agregados de nanocristales

60

En la presente invención, el objetivo principal de la funcionalización de los agregados de nanocristales obtenidos y seleccionados durante las etapas anteriores es producir un revestimiento de los agregados que maximiza la atracción mutua entre masas tumorales *in vivo* y partículas submicrométricas.

Según la presente invención, pueden utilizarse moléculas de diversos tipos con el fin de obtener el revestimiento de los agregados de nanocristales magnéticos: sustancias para las cuales las células tumorales presentan una

65

avidez metabólica particular (por ejemplo hidratos de carbono de monosacáridos, en particular glucosa); sustancias que presentan una afinidad bioquímica con las células tumorales (por ejemplo anticuerpos monoclonales); sustancias que presentan una afinidad con el microentorno ácido que rodea a las células neoplásicas (por ejemplo polisacáridos lineales tales como quitosano).

Por ejemplo, en el caso de un revestimiento con hidratos de carbono de monosacáridos, la presente invención prevé utilizar procedimientos de síntesis orgánica convencionales con el fin de formar los separadores biocompatibles con una forma lineal de longitud variable. Un primer extremo (extremo distal) de cada separador está provisto de moléculas, por ejemplo glucosa, mientras que el extremo (extremo proximal) está provisto de un grupo que presenta una alta afinidad frente a las propiedades magnéticas de los nanocristales (tal como carboxilatos, fosfonatos y fosfatos).

En el caso de neoplasmas malignos localizados en los denominados "sitios santuario", tales como el sistema nervioso central (SNC) y los testículos, en los que la barrera hematoencefálica y la barrera hematotesticular están respectivamente presentes, el revestimiento tiene por tanto el efecto de poner los nanocristales magnéticos en contacto directo con, aunque no en el interior de, las células tumorales. Dicho de otro modo, se obtiene una concentración de los nanocristales magnéticos en la región alrededor de las células tumorales.

A continuación, se proporciona un ejemplo de implementación del procedimiento ilustrado anteriormente únicamente a modo de ejemplo no limitativo.

Etapa A – Tratamiento mecanoquímico

Según una posible forma de realización de la etapa A, puede utilizarse un reactor mecanoquímico del tipo descrito en la solicitud de patente WO2012/085782 ya mencionada provisto de bolas de molienda con un peso de 15 kg y que funciona con una frecuencia de oscilación de 15 Hz. El material magnético en polvo introducido en el reactor para su tratamiento puede presentar un peso global de 1,5 kg y puede ser magnetita (Fe_3O_4) con una distribución media de las partículas de 35 μm : por consiguiente, la razón entre material que va a tratarse y los medios de molienda es de 1:10. Tras someterse a un vacío, puede llenarse la cámara de molienda del reactor, por ejemplo, con argón puro al 99,99% con el 2% de oxígeno añadido.

El tratamiento puede durar 4 horas y puede dar lugar a aproximadamente 1 kg de agregados con dimensiones de menos de 400 nm. A continuación, pueden someterse los agregados a caracterización con difracción de rayos X y evaluación utilizando la ecuación de Scherrer. Ventajosamente, los agregados pueden estar formados por cristales de magnetita con un tamaño promedio inferior a 10 nm (nanocristales magnéticos).

Etapa B – Dispersión (desagregación) de los agregados

Para esta etapa puede utilizarse un molino de trituración convencional, por ejemplo del tipo comercialmente distribuido por Union Process Inc. (E.E.UU.) y provisto de bolas de molienda compuestas por óxido de circonio con un diámetro de 300 μm y un peso global de 2 kg, relleno con 2 litros de agua y que funciona a una velocidad de rotación de 100 rpm. Pueden cargarse 300 g de polvo (agregados de nanocristales de magnetita obtenidos en la etapa A) en el molino de trituración. Al final de un tiempo de proceso de 2 horas puede obtenerse una dispersión acuosa de partículas, consistiendo la distribución en peso de la misma en el 90% de partículas con un tamaño inferior a 60 nm que puede medirse ventajosamente utilizando un difractor de láser, por ejemplo del tipo distribuido comercialmente por Malvern Instruments Ltd (R.U.). Utilizando un conjunto de filtros con dimensiones que oscilan entre 8 μm y 50 nm, es posible obtener un líquido que consiste en aproximadamente 2 litros de agua y en el que se forma una dispersión sólida de partículas agregadas de nanocristales de magnetita con un tamaño promedio de 10 nm para aproximadamente 100 g.

Etapa C – Selección magnética de los nanocristales

Puede hacerse pasar la disolución obtenida al final de la etapa B y con la temperatura controlada a 42°C a través de un primer filtro magnético que también se mantiene a 42°C para capturar las partículas que presentan una temperatura de Curie superior a este valor. Tras reducir la temperatura hasta 38°C, puede hacerse pasar la disolución así seleccionada a través de un segundo filtro magnético diferente mantenido a 38°C para capturar las partículas con una temperatura de Curie superior a 38°C y por tanto dentro del intervalo deseado, es decir entre 38°C ($T_{\text{mín}}$) y 42°C ($T_{\text{máx}}$) para su posterior uso terapéutico. Las partículas "útiles" de magnetita, concretamente las seleccionadas de esta manera, pueden representar en total aproximadamente 30 g de peso (el 10% en comparación con los 300 g iniciales).

El fluido seleccionado con partículas que presentan una temperatura de Curie de menos de 38°C también puede reponerse, en la misma proporción en peso, con las partículas seleccionadas en el intervalo de temperatura de 38-42°C, para formar un sistema que comprende la fracción superparamétrica a una temperatura corporal (útil para formación de imágenes básicas) complementado con las partículas útiles para el tratamiento.

Etapa D – Funcionalización

En la presente invención, el objetivo primario de la funcionalización de los agregados de nanocristales obtenidos y seleccionados durante las etapas anteriores es producir un revestimiento de los agregados que maximiza la atracción mutua entre masas tumorales *in vivo* y partículas submicrométricas, que puede ser por ejemplo glucosa. En el caso de partículas de óxido magnéticas, como en este ejemplo, puede ser particularmente útil, por ejemplo, utilizar un revestimiento de las partículas con silanos (silanización) que permite tanto la unión de diversas sustancias portadoras como la dispersión de las partículas en agua, facilitando su estabilidad en una disolución acuosa.

Las partículas seleccionadas en la etapa C pueden dispersarse en agua en una concentración del 5% y puede realizarse la silanización utilizando 3-aminopropiltrietoxisilano, dejando por ejemplo la dispersión a 40°C durante 3 horas. Calentando posteriormente la misma dispersión hasta 70°C con glucosa en una disolución acuosa concentrada, puede obtenerse una fructosamina R-NH-CH₂-CO-(CHOH)₃-CH₂OH que recubre la partícula individual según la reacción de Amadori. La dispersión estable así obtenida puede utilizarse directamente para inyección intravenosa en la cantidad de 30 micromoles de Fe/kg de peso corporal.

Según la presente invención, una forma preferida de utilización oncológica de las partículas submicrométricas se realiza con un aparato novedoso que se basa en un sistema de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) convencional, manteniéndose sustancialmente todas las partes del mismo, y que comprende además una o más bobinas de inducción para generar un campo electromagnético oscilante, así como medios para regular los parámetros del campo y dirigirlo hacia la zona del cuerpo del paciente en la que se supone que está presente el neoplasma.

Con este aparato, es posible realizar tanto el diagnóstico (y monitorización) como el tratamiento de los neoplasmas, sin interrupción, es decir de una manera continua, mientras se mantiene la postura del paciente sin alterar.

La etapa de diagnóstico es en sí misma convencional en cuanto a que determina la ubicación de los agregados magnéticos (presentes en las partículas submicrométricas anteriormente introducidas en el cuerpo del paciente por vía intravenosa) en la región de las células tumorales, debido a la "atracción" que ejercen estas últimas sobre las moléculas de su revestimiento.

Durante el tratamiento, el campo electromagnético generado por las bobinas de inducción da como resultado el calentamiento de los nanocristales que, tras la selección de los mismos, tal como ya se describió anteriormente, permanecen con certeza dentro del intervalo de variación predefinido de la temperatura de Curie. El calentamiento se interrumpe de manera instantánea mientras que, al mismo tiempo, los nanocristales ya no puede "visualizarse" mediante los medios de diagnóstico debido al hecho de que han perdido sus propiedades magnéticas. Como resultado, es posible establecer un principio que garantiza la destrucción específica y selectiva de las células tumorales, sin dañar los tejidos sanos, incluyendo aquellos que están en la proximidad inmediata de los neoplasmas.

Más particularmente, el procedimiento terapéutico puede llevarse a cabo, por ejemplo, con una masa visible cuyo seguimiento se realiza con IRM (formación de imágenes por resonancia magnética) convencional. Tras el tratamiento previo con cortisonas y antihistamínicos, la dispersión anteriormente mencionada procedente de la etapa D seleccionada dentro del intervalo de temperatura de Curie de 38-43°C puede inyectarse por vía intravenosa. Puede utilizarse una bobina de inducción con un campo inducido de 7 KA/m a la frecuencia de 100 KHz, por ejemplo, para el tratamiento, habiéndose colocado dentro de una máquina de resonancia magnética. La parte que va a tratarse se inserta dentro de la bobina tras la anestesia. Antes de la aplicación del campo, la IRM provoca una reducción en la señal en la región de la masa debido a la acumulación de las partículas magnéticas provocada por el portador de glucosa. Tras la aplicación del campo inducido, tal como se describió anteriormente, después de aproximadamente 5 minutos, la imagen en la región de la masa tumoral puede observarse destacada. Esto se debe a la introducción gradual en el campo superparamagnético de las partículas dentro del intervalo de temperatura de 38-43°C. Las zonas que rodean la masa tumoral, durante el tratamiento que puede durar una hora en total, son estables en la señal de IRM, sin detectarse ninguna alteración térmica sustancial en las mismas. Ventajosamente, un análisis de la masa tumoral y el tejido circundante puede revelar un grado considerable de necrosis celular de la masa tumoral sin daño del tejido sano.

Se entiende que otras variaciones y formas de realización quedan incluidas dentro del alcance de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de partículas submicrométricas para el tratamiento *in vivo* de células tumorales, que comprende las etapas siguientes:
- 5
- A. tratamiento mecanoquímico de materiales magnéticos en polvo, homogéneos o heterogéneos en una atmósfera controlada, y en presencia de una fase líquida de no más del 5% en volumen, hasta que se obtenga una masa consistente con por lo menos el 80% en volumen de agregados magnéticos principalmente con unas dimensiones inferiores a 500 nm, estando dichos agregados formados por unos
- 10 nanocristales magnéticos principalmente con unas dimensiones inferiores a 100 nm;
- B. dispersión de los agregados magnéticos en un fluido;
- C. selección y distribución dimensional de los agregados magnéticos presentes en dicho fluido dependiendo de su temperatura de Curie dentro de un intervalo de variación predefinido (T_{\min} - T_{\max});
- 15
- D. funcionalización mediante el revestimiento de los agregados con sustancias diseñadas para generar una atracción mutua entre las células tumorales y los nanocristales de los agregados magnéticos.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tratamiento mecanoquímico tiene lugar, en un molino de alta energía o, alternativamente, en un reactor mecanoquímico, en el que se mantiene una atmósfera con un contenido de oxígeno controlado.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la selección y la distribución
- 25 dimensional de los agregados de nanocristales magnéticos dispersados en un fluido biocompatible comprende en sucesión:
- a) calentar y mantener el fluido a la temperatura máxima del intervalo de variación predefinido T_{\max} ;
- 30
- b) retirar del fluido por medio de un primer filtro magnético los agregados que presentan una temperatura de Curie superior a T_{\max} ;
- c) enfriar el fluido del cual se han retirado dichos agregados hasta la temperatura mínima dentro del intervalo de variación predefinido T_{\min} y mantener el fluido a dicha temperatura;
- 35
- d) retirar del fluido por medio de un segundo filtro magnético los agregados que presentan una temperatura de Curie dentro del intervalo T_{\min} - T_{\max} con vistas a una utilización oncológica posterior.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la funcionalización de los agregados se realiza utilizando moléculas de sustancias para las cuales las células tumorales presentan una avidéz
- 40 metabólica particular, tales como hidratos de carbono de monosacáridos, en particular glucosa.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la funcionalización de los agregados se realiza utilizando moléculas de sustancias que presentan una afinidad bioquímica con las células tumorales, tales como los anticuerpos monoclonales.
- 45
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la funcionalización de los agregados se realiza utilizando moléculas de sustancias que presentan una afinidad con el microentorno ácido que rodea a las células tumorales, tales como polisacáridos lineales, en particular quitosano.
- 50
7. Partículas submicrométricas para un uso teranóstico en el tratamiento de neoplasmas, obtenidas según los procedimientos de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprenden:
- un agregado de nanocristales de por lo menos uno de entre los siguientes materiales magnéticos: óxidos de

55 hierro, también de naturaleza mixta y compleja; compuestos intermetálicos y aleaciones magnéticas que contienen hierro; sistemas magnéticos que consisten en hierro con otros metales;

 - un revestimiento de dicho agregado de nanocristales magnéticos que comprende moléculas de por lo menos uno de entre los siguientes tipos de sustancias: sustancias para las cuales las células tumorales

60 presentan una avidéz metabólica particular; sustancias que presentan una afinidad bioquímica con las células tumorales; sustancias que presentan una afinidad con el microentorno ácido que rodea a las células neoplásicas.
8. Partículas submicrométricas para un uso teranóstico en oncología, en las que dichas partículas
- 65 submicrométricas se producen con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y/o la reivindicación 7, que comprenden en sucesión y sin interrupción las etapas siguientes:

- A. introducir por vía intravenosa las partículas submicrométricas en el cuerpo del paciente utilizando una solución fisiológica compatible;
- 5 B. diagnóstico y/o monitorización de células tumorales por medio de la localización de los agregados de nanocristales magnéticos concentrados en las proximidades o en el interior de dichas células como resultado de la atracción de las moléculas del revestimiento de los agregados de nanocristales magnéticos por medio de un sistema de formación de imágenes por resonancia magnética conocido en sí mismo;
- 10 C. calentamiento localizado, inductivamente, de los nanocristales magnéticos hasta una temperatura dentro de un intervalo de variación predefinido de la temperatura de Curie que tiene, como efecto, la destrucción de las células tumorales por medio de hipertermia magnética;
- 15 D. detección de la pérdida de las propiedades magnéticas de los nanocristales tras alcanzar la temperatura de Curie por medio de dicho sistema de formación de imágenes conocido en sí mismo; y
- E. detención simultánea de dicha operación de calentamiento para garantizar que el tejido sano que rodea a las células tumorales permanece sin daños, dado que está a una temperatura inferior.
- 20 9. Aparato para implementar un uso teranóstico en oncología según la reivindicación 8, comprendiendo el aparato un sistema de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) conocido en sí mismo, unas partículas submicrométricas obtenidas con el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y que además comprende unos medios para generar un campo electromagnético diseñado para calentar inductivamente, hasta un valor dentro de un intervalo de variación predefinido de la temperatura de Curie, los
- 25 agregados de nanocristales magnéticos que forman parte de las partículas submicrométricas anteriormente introducidas por vía intravenosa en el cuerpo del paciente.
- 30 10. Aparato para implementar un uso teranóstico en oncología según la reivindicación 9, caracterizado por que dichos medios de calentamiento están diseñados para detenerse tras la pérdida de las propiedades magnéticas de las nanopartículas.
- 35 11. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que los medios para generar un campo electromagnético variable comprenden una o más bobinas de inducción y unos medios para hacer variar los parámetros de dicho campo y dirigirlo hacia la zona del cuerpo del paciente en la que se supone que está presente un neoplasma.