

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 902**

21 Número de solicitud: 201730941

51 Int. Cl.:

A61K 49/04 (2006.01)

C09K 11/02 (2006.01)

H01F 1/11 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.01.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PROGRESO Y
SALUD (60.0%)**

Avda. Américo Vespucio nº5 Bloque 2-2ª

(Isla de la Cartuja)

41092 Sevilla ES y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (40.0%)

72 Inventor/es:

DE LA CUEVA MÉNDEZ, Guillermo;

CANO LUNA, Manuel;

JIMÉNEZ HOYUELA, José Manuel y

DELGADO GARCÍA, Alberto

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **NANOPARTÍCULAS BASADAS EN SÍLICE MODIFICADAS EN SUPERFICIE PARA MEJORAR
LA ADSORCIÓN QUÍMICA**

57 Resumen:

La presente invención ha desarrollado un método genérico para la fabricación de NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs), que una vez recubiertas con una capa gruesa de silica, usando derivados silano-amino primario y/o hidroxilo (usando por ejemplo los químicos TEOS y/o APTES), adquieren buenas propiedades para la adsorción química de radioisótopos metálicos PET/SPECT (por ejemplo, 67Ga, 111In, 89Zr, etc.), y/o de fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina...) en su superficie, y por tanto con un gran potencial para su aplicación en biomedicina.

ES 2 696 902 A1

DESCRIPCIÓN

**NANOPARTÍCULAS BASADAS EN SÍLICE MODIFICADAS EN SUPERFICIE
PARA MEJORAR LA ADSORCIÓN QUÍMICA**

CAMPO DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina, de la química, la bioquímica, y se refiere a un sistema para el transporte que comprende nanopartículas basadas en sílice modificadas en su superficie con grupos aminos primarios con gran capacidad para la adsorción química de radioisótopos o radiofármacos metálicos, agentes quimioterapéuticos o fármacos, o moléculas biológicamente activas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La nanotecnología es una disciplina con un gran potencial para contribuir al desarrollo de nuevos radio-trazadores multimodales (PET/RM o SPECT/RM) con capacidad de vehicular agentes de contraste y fármacos a sus sitios de acción específica, de forma selectiva e *in vivo* [Jarzyna P.A. et al., 2010. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2, 138-150; Bouziotis P. et al., 2012. Curr. Top. Med. Chem. 12, 2694-2702; Ferro-Flores G. et al., 2014. Curr. Med. Chem. 21, 124-138; Ai F. et al., 2016. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 8, 619-630]. Esto es principalmente debido a que la composición química, el tamaño y la forma de las nanopartículas pueden ser controlados durante el proceso de síntesis. Además, a diferencia de los agentes de contraste convencionales, las nanopartículas poseen una elevada superficie específica, la cual puede ser fácilmente modificada para conferirle 2 o más propiedades adicionales permitiendo su uso como agente de contraste en varias modalidades de imagen *in vivo* de manera simultánea [Key J. et al., 2014. International Journal of Nanomedicine 9, 711-726; Estelrich J. et al., 2015. International Journal of Nanomedicine 10, 1727-1741].

20

25

En la actualidad existen dos estrategias generales para el desarrollo de estos radiotrazadores multimodales que empleen nanopartículas (NPs) de óxido de hierro y radioisótopos metálicos:

30

(1) Una de ellas, son las basadas en el **“uso de agentes quelantes”** y consisten en funcionalizar la superficie de las NPs de óxido de hierro con estos ligandos para permitir su marcaje con **radioisótopos metálicos**. Este proceso no es sencillo y

puede resultar bastante costoso, ya que requiere de una modificación química previa del agente quelante empleado para facilitar su unión química a la superficie de las NPs previamente sintetizadas pero sin afectar a sus propiedades quelantes. Un indicador de la complejidad de este proceso es que muchos investigadores están trabajado en métodos de síntesis de derivados de agentes quelantes con el objetivo de facilitar su anclaje a la superficie de las NPs o de moléculas biológicas de interés (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) [Jurek P. PCT WO 2008/124467; Vosjan M.J.W.D. et al, Nature Protocols 5, 739-743;-Berry D.J. et al., 2011. Chem. Commun. 47, 7068-7070; Singh A.N. et al., 2011. Bioconjugate Chem. 22, 1650–1662; Patra M. et al., 2014. Chem. Commun. 50, 11523-11525].

(2) La otra estrategia para el desarrollo de estos nanosistemas multimodales se basa en **“no usar agentes quelantes”** y consiste en atrapar los **radioisótopos metálicos** en el núcleo de las NPs de óxido de hierro durante el proceso de síntesis [Zeng J. et al., 2014. Chem. Commun. 50, 2170-2172; Ai F. et al., 2016. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 8, 619-630; Pellico J. et al., 2016. Contrast Media Mol. Imaging. 11, 203-210]. La principal ventaja de este tipo de estrategias es el abaratamiento de los costes de fabricación del nanotrazador multimodal, ya que no requiere el uso de agentes quelantes, mientras que su principal inconveniente está en la complejidad que conlleva trabajar en condiciones de radiactividad, tanto en el proceso de síntesis como durante las etapas de purificación y caracterización de las NPs resultantes. Otro posible inconveniente de esta estrategia, sobre todo cuando la síntesis se lleva a cabo por co-precipitación, es la baja calidad de las NPs de óxido de hierro obtenidas (en términos de control y distribución de tamaños, cristalinidad, etc.) [Pellico J. et al., 2016. Contrast Media Mol. Imaging. 11, 203-210].

La presente invención describe un método genérico para la fabricación de NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) y recubiertas de una capa de Sílica que poseen propiedades intrínsecas para la adsorción química fuerte de radioisótopos metálicos PET (por ejemplo, ^{68}Ga , ^{89}Zr) y/o SPECT (por ejemplo, ^{67}Ga , ^{111}In) y/o de fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina). Esto supone una importante ventaja competitiva (bajo coste y sencillo uso) a la hora de fabricación de este tipo de radiotrazadores multimodales de diagnóstico (PET/RM o SPECT/MR) y/o terapéuticos (vehiculización de fármacos quimioterapéuticos) en oncología, neurología, cardiología, gastroenterología, etc...

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de esta invención han desarrollado una nueva estrategia para el desarrollo de radiotrazadores multimodales (PET/RM o SPECT/RM) que no requiere el uso de agentes quelantes y que se basa en la adsorción química fuerte de **radioisótopos metálicos** sobre la superficie de las nanopartículas de óxido de hierro. Este método presenta una serie de ventajas competitivas frente a las estrategias anteriormente comentadas, entre las que destacan su bajo coste y simplicidad. Además, se pueden emplear nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs) de elevada calidad, como son las obtenidas por métodos de descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro. Para esta invención, los autores han desarrollado una nanopartícula compuesta de un núcleo de SPION con propiedades de contraste T2-RMI y con un recubrimiento de capa gruesa de sílica que protege el “núcleo” y además aporta grupos aminos primarios a la superficie del nanocompósito. Los experimentos de caracterización físico-química revelaron que estas NPs compuestas generadas (SPION/Silica núcleo/recubrimiento) presentaban una elevada capacidad para la adsorción química de **radioisótopos metálicos PET** (por ejemplo, ^{89}Zr o ^{68}Ga) **y/o SPECT** (por ejemplo, ^{67}Ga o ^{111}In) gracias al recubrimiento de sílica con grupos aminos primarios expuestos en superficie. Además, se pudo demostrar que esta capacidad de adsorción de radioisótopos propia de las NPs compuestas generadas, SPION/Silica con grupos amino primarios en superficie, se mantenía incluso después de su funcionalización parcial con polietilenglicol (PEG); polímero empleado comúnmente para aumentar la estabilidad coloidal y el tiempo en circulación de nanopartículas [Sandiford L. et al., 2013. ACS nano 7, 500-512; del Pino P. et al., 2016. Angew. Chem. Int. Ed. 55, 5483-5487; Cano M. et al., 2017. Nanoscale 9, 812-822]. También se comprobó que estos nanocompósitos de SPION/Silica, parcialmente PEGilados y con grupos amino primarios en superficie, tenían la capacidad de adsorber químicamente en superficie fármacos quimioterapéuticos basados en metales, como es el caso del cisplatino, lo cual extiende su potencial uso como agentes terapéuticos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática de la síntesis por microemulsión inversa de nanopartículas compuestas de un núcleo superparamagnético de óxido de hierro (SPION) y un recubrimiento de capa gruesa de sílica (SPION/Silica (núcleo/recubrimiento) NPs), las cuales contienen grupos amino primarios expuestos en superficie para conferirle la

capacidad de adsorción química de metales. Tanto las moléculas como las NPs no están dibujadas a escala.

Figura 2. Imágenes TEM de las NPs (A) SPION-OA y de las NPs compuestas core/shell SPION/Silica sin (B) y con PEG (C).

5 **Figura 3.** (A) Isotherma de adsorción-desorción de Nitrógeno obtenida para las NPs compuestas SPION/Silica (núcleo/recubrimiento) de esta invención. (B) Espectro XPS obtenido para las NPs SPION-OA (negro) y para las NPs compuestas SPION/Silica (núcleo/recubrimiento) (rojo). (C) Espectro UV-visible de NPs compuestas SPION/Silica (azul) y SPION/Silica-PEG (rojo) tratadas con ninhidrina. También se muestra un control
10 positivo (50 ppm L-metionina; línea negra continua) y otro negativo (Agua; línea negra discontinua).

Figura 4. (A) FTIR, (B) TGA y (D) VSM análisis de las NPs SPION-OA y de las NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/Silica sin y con PEG. (C) Curvas de potencial-zeta a distintos pHs del medio para las NPs compuestas core/shell SPION/Silica con y sin
15 PEG.

Figura 5. Citotoxicidad de las células HepG2 tratadas con las NPs compuestas SPION/Silica (núcleo/recubrimiento) con y sin PEG. (A) Número total de células en cultivo tratadas con las concentraciones indicadas de NPs durante 24 y 48 horas. (B) Número total de células muertas en cultivo analizadas en A. (C) Porcentaje de células muertas en las mismas
20 células analizadas en A. (D) Imágenes representativas de la línea celular HepG2 tratada con las concentraciones indicadas de NPs durante 48 horas y mostrando las células totales (tinción azul) y las células muertas (tinción amarilla).

Figura 6. Imágenes phantom de MRI mostrando el contraste positivo (T1) y negativo (T2) producido por las NPs compuestas core/shell SPION/Silica antes y después de la
25 PEGilación.

Figura 7. Imágenes T2W representativas obtenidas a partir de ratones con un tumor subcutáneo implantado a partir de células 4T1.2 de cáncer de mama, antes y después de la administración intravenosa de 40 mg·Kg⁻¹ de NPs compuestas core/shell SPION/Silica PEGiladas. Cada tiempo experimental es representado por cuatro cortes mostrando las
30 relajatividades del tumor, riñones e hígado (cortes axial y coronal).

Figura 8. (A) Radio-TLC de la cinética de carga de ^{67}Ga en las NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica con y sin PEG. (B) Radio-TLC control de ^{67}Ga -Citrato sin NPs. (C) Cuantificación de la pureza radioquímica (%) obtenida en A.

Figura 9. Evaluación por radio-TLC de la liberación en el tiempo del ^{67}Ga cargado en las NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica con y sin PEG, después de 3 horas de incubación y posterior purificación, (A) en buffer fosfato (PBS) o (C) en suero fetal bovino (FBS), ambos a pH 7.4. (B) Cuantificación de la pureza radioquímica (%) a partir de A. (D) Igual que B pero a partir de C.

Figura 10. Evaluación por TLC de la cinética de carga de ^{89}Zr -oxalato (A,B) y su liberación en el tiempo en PBS 0.1 M a pH 7.4 (C,D) sobre las NPs compuestas core/shell SPION/Sílica con y sin PEG. A y C son imágenes cualitativas obtenidas por PSP. B y D representan su cuantificación mediante contador de pozo.

Figura 11. Cantidad adsorbida de Cisplatino sobre las NPs compuestas core/shell SPION/Sílica con y sin PEG.

Figura 12. (A) Esquema de la reacción de conjugación del colorante-fluoróforo azul (Cy5-NHS) sobre las NPs (núcleo/recubrimiento) SPION/Silica de esta invención. (B) Fotografía de las NPs compuestas antes y después de su modificación con el colorante Cy5 en estado sólido. (C, D) Espectros UV-visible de absorción (C) y de emisión (D) de las NPs compuestas core/shell SPION/Silica antes (negro) y después (rojo) de la funcionalización con Cy5, y el Cy5 libre (azul).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención ha desarrollado un método genérico para la fabricación de NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs), que una vez recubiertas con una capa gruesa de sílica, usando derivados silano-amino primario y/o hidroxilo (usando por ejemplo los químicos TEOS (tetraetil ortosilicato) y/o APTES (3-aminopropiltriétoxosilano), adquieren buenas propiedades para la adsorción química de radioisótopos metálicos PET/SPECT (por ejemplo, ^{67}Ga , ^{111}In , ^{89}Zr , etc.), y/o de fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino, doxorubicina...) en su superficie, y por tanto con un gran potencial para su aplicación en biomedicina.

Esta invención demuestra también que las NPs compuestas por SPION/Silica, (núcleo/recubrimiento), con grupos amino primarios e hidroxilos en superficie, mantienen la capacidad de adsorción química incluso después de su funcionalización con Polietilenglicol (PEG); polímero hidrofílico muy usado para aumentar la solubilidad de las NPs, disminuyendo a su vez la interacción con las proteínas plasmáticas (opsonización) y aumentando el tiempo en circulación de estas NPs. Además, los estudios de citotoxicidad desarrollados muestran la buena biocompatibilidad de estas NPs compuestas con y sin PEG.

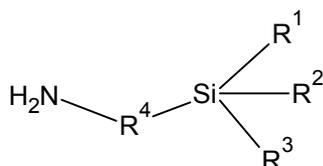
Esta invención es válida para todas aquellas aplicaciones industriales que impliquen el uso de materiales con capacidad intrínseca para la adsorción química en su superficie de radioisótopos o radiofármacos metálicos PET/SPECT (diagnóstico) y/o fármacos quimioterapéuticos (terapia). Las dos grandes aplicaciones biomédicas de estas NPs serían, por tanto, como radiotrazadores multimodales (PET/RMI, SPECT/RMI, Óptico/MRI/SPECT, Óptico/MRI/PET) en diagnóstico (por ejemplo, como agentes de contraste multimodal para la detección visual, por fluorescencia o con gamma cámara de los ganglios centinela en cáncer de mama) y/o en terapia (vehiculizando fármacos quimioterapéuticos como el cisplatino). Otra importante aplicación de esta invención, debido a su gran capacidad de adsorción superficial de metales, sería en la industria nuclear como fase estacionaria de dispositivos (como por ejemplo, columnas cromatográficas) que permitan la concentración de los eluidos de radioisótopos metálicos procedentes de sus correspondientes Generadores.

A continuación procedemos a detallar las nanopartículas de la invención, así como otros aspectos de la invención.

NANOPARTÍCULAS DE LA INVENCION

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a una nanopartícula basada en sílice, de ahora en adelante nanopartículas de sílice de la invención. Las nanopartículas de sílice de la invención son inertes, biodegradables y presentan una buena biodistribución. Además, son fácilmente sintetizables y se pueden obtener de distinta forma y tamaño.

En una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la nanopartícula está modificada en su superficie con grupos aminos primarios (R-NH₂), grupos hidroxilo (R-OH), o una combinación de ambos. En otra realización aún más preferida, los grupos aminos primarios son derivados del silano. En otra realización aún más preferida, el derivado de silano con grupo amino primario presenta la fórmula (I):



Formula I

donde

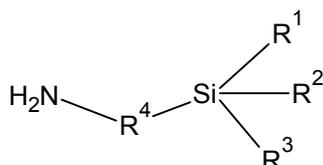
5 R^1 , R^2 y R^3 puede ser indistintamente cualquier de los siguientes grupos: $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$; y

R^4 puede ser cualquier grupo funcional, preferiblemente se selecciona de la lista que consiste en: $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2-$ y $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$.

10 En otra realización preferida, las nanopartículas de sílice de la invención son porosas. Más preferiblemente, las nanopartículas de sílice de la invención presentan poros de un diámetro comprendido entre los 1 y 50 nm. Esta singularidad proporciona a estas NPs dos dominios diferenciados: una superficie externa y otra interior en los poros.

En otra realización preferida, las nanopartículas de sílice de la invención tienen núcleo superparamagnético.

15 En aun otra realización especialmente preferida de la invención, las nanopartículas tienen un núcleo superparamagnético con un diámetro medio de 10.6 +/- 1.2 nm (calculado a partir de la medida del diámetro de 40 nanopartículas a partir de imágenes de TEM), y están modificadas en su superficie con grupos aminos primarios (R-NH_2), grupos hidroxilo (R-OH), o una combinación de ambos. Preferiblemente dichas nanopartículas, están modificadas en su superficie con grupos aminos primarios (R-NH_2) derivados del silano. En otra realización
20 aún más preferida, el derivado de silano con grupo amino primario presenta la fórmula (I):



Formula I

donde

R1, R2 y R3 puede ser indistintamente: -OCH₃, -OCH₂-CH₃, -OCH₂-CH₂-CH₃: y

R4 puede ser cualquier grupo funcional, preferiblemente se selecciono de la lista que consiste en: -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂- y NH-CH₂-CH₂-CH₂-.

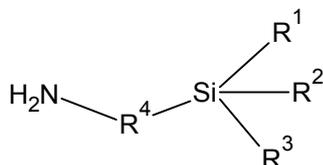
5

Se hace notar que preferiblemente el tamaño medio de la nanopartículas compuestas por el núcleo superparamagnético y la superficie modificada con grupos aminos primarios (R-NH₂), preferiblemente con sílica (SPIONs/sílica núcleo/cubierta), es de 94.3 +/- 3.6 nm y que el espesor medio de la capa de sílica es de 41.9 +/- 2.4 nm.

10 Además se hace notar que preferiblemente el número de grupos aminos de la nanopartículas compuestas por el núcleo superparamagnético y la superficie modificada con grupos aminos primarios (R-NH₂) sin funcionalizar, es superior a 2.8×10^5 , preferiblemente aproximadamente +/- 30 % de 4.5×10^5 .

15 Adicionalmente, se hace notar que la nanopartículas compuestas por el núcleo superparamagnético y la superficie modificada con grupos aminos primarios (R-NH₂) son porosas. Más preferiblemente, las nanopartículas de sílice de la invención presentan poros de un diámetro comprendido entre los 1 y 50 nm, ausencia de microporos y presencia de mesoporos. Por otro lado, las nanopartículas compuestas por el núcleo superparamagnético y la superficie modificada con grupos aminos primarios (R-NH₂) presentan un área de superficie-BET de +/- 20% 36.15 m²/g y un volumen de poro de +/- 20% de 0.47 cm³/g, valores que fueron calculados a partir de las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [Banerjee S. et al., 2015. RSC Advances, 5, 14425-14440].

20 En aún otra realización especialmente preferida de la invención, las nanopartículas tienen un núcleo superparamagnético con un diámetro medio de 10.6 +/- 1.2 nm (calculado a partir de la medida del diámetro de 40 nanopartículas a partir de imágenes de TEM), y están modificadas en su superficie con grupos aminos primarios (R-NH₂) derivados de silano con fórmula (I):



Formula I

donde

R1, R2 y R3 se seleccionan indistintamente de la lista que consiste en: -OCH₃, -OCH₂-CH₃, y -OCH₂-CH₂-CH₃; y

- 5 R4 puede ser cualquier grupo funcional, preferiblemente se selecciona de la lista que consiste en: -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂- y NH-CH₂-CH₂-CH₂-.

Además, dichas nanopartículas presentan las siguientes características;

- Un diámetro de partícula de 94.3 +/- 3.6 nm;
- 10 - Un espesor medio de la capa de grupos aminos primarios (R-NH₂) derivados de silano de 41.9 +/- 2.4 nm;
- Un número de grupos aminos derivados de silano superior a 2.8×10^5 , preferiblemente de aproximadamente +/- 30 % de 4.5×10^5 ; así como
- Poros de un diámetro comprendido entre los 1 y 50 nm, ausencia de microporos y
- 15 presencia de mesoporos con un área de superficie-BET de +/- 20% 36.15 m²/g y un volumen de poro de +/- 20% de 0.47 cm³/g, valores que fueron calculados a partir de ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y de Barrett-Joyner-Halenda (BHD)

Las nanopartículas de la invención se pueden funcionalizar, preferiblemente con polietilenglicol (PEG) o con Cianina Cy5. Además, se hace notar que el tamaño medio de este tipo de nanopartículas se puede medir mediante procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Adicionalmente, las nanopartículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partículas inferior a 1 μm, preferentemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 y 110 nm, preferentemente entre 50 y 80 nm. Por "diámetro medio" se entiende el diámetro promedio de la población de nanopartículas dispersa en un medio acuoso. El diámetro medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia y que se describen, por ejemplo, en la referencia [Cano M. et al., 2017. Nanoscale 9, 812-822].

30 La síntesis de la nanopartícula se describe más extensamente a lo largo de la presente invención.

SISTEMA DE TRANSPORTE DE LA INVENCION

Además, los inventores de la presente invención han desarrollado un sistema de transporte de ligandos tales como radioisótopos, fármacos, moléculas biológicas o marcadores, sobre la base de las nanopartículas, tal y como se han definido estas en el apartado anterior. Este sistema, permite la adsorción de los ligandos, y particularmente la adsorción química de radioisótopos PET/SPECT, sin necesidad de funcionalizar las nanopartículas con grupos quelantes.

Por tanto, un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un sistema de transporte, de ahora en adelante sistema de transporte de la invención, que preferiblemente no presenta un agente quelante, y comprende:

- una nanopartícula de la invención,
- un agente marcador o radioisótopo, y/o
- una molécula biológicamente activa o un agente terapéutico o fármaco, preferiblemente un agente quimioterapéutico.

En el contexto de la presente invención, radioisótopo es una molécula biológicamente activa, agente terapéutico o fármaco, o un agente marcador. Las moléculas biológicamente activas pueden incluir desde fármacos de bajo peso molecular hasta moléculas del tipo de polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos y combinaciones de las mismas.

La expresión "molécula biológicamente activa" tiene un sentido amplio y comprende moléculas tales como fármacos de alto, o más preferentemente, de bajo peso molecular, polisacáridos, proteínas, péptidos, lípidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos, así como combinaciones de las mismas. En una variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene como función prevenir, paliar, curar o diagnosticar enfermedades. En otra variante de la invención la molécula biológicamente activa tiene una función cosmética.

En esta memoria el término "molécula biológicamente activa" incluye también los términos "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo", "agente terapéutico", "fármaco" o "ingrediente farmacéuticamente activo", es decir, significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales.

Incluye también a los “cosméticos”. Preferiblemente, cuando nos referimos a agente terapéuticos dichos agentes incluyen un metal en su formulación, y donde preferiblemente dichos fármacos son agentes quimioterapéuticos tal y como el cisplatino.

Preferentemente, el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención puede comprender más de una molécula biológicamente activa distinta. En una realización preferida, la molécula biológicamente activa es de bajo peso molecular. En otra realización preferida esta molécula es hidrofílica.

Así pues, la molécula biológicamente activa se puede incorporar al sistema transportador de forma no covalente, de manera general mediante interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, adsorción superficial o encapsulación o intercalado en el interior de la misma.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el agente marcador se selecciona de entre: Isótopos, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluoróforos, cromóforos o radioisótopos. Más preferiblemente el radioisótopo es un PET/SPECT. En otra realización preferida, el radioisótopo se selecciona de entre Tritio (^3H), Carbono-11 (^{11}C), Nitrógeno-13 (^{13}N), Oxígeno-15 (^{15}O), Flúor-18 (^{18}F), Fósforo-32 (^{32}P), Fósforo-33 (^{33}P), Azufre-35 (^{35}S), Cobalto-56 (^{56}Co), Cobalto-57 (^{57}Co), Cobalto-58 (^{58}Co), Cobalto-60 (^{60}Co), Cromo-51 (^{51}Cr), Cobre-62 (^{62}Cu), Cobre-64 (^{64}Cu), Galio-66 (^{66}Ga), Galio-67 (^{67}Ga), Germanio-68 (^{68}Ge) en equilibrio con Galio-68 (^{68}Ga), Rubidio-81 (^{81}Rb) en equilibrio con Galio-68 (^{68}Ga), Rubidio-81 (^{81}Rb) en equilibrio con Krypton-81m ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), Krypton-81m ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), Itrio-86 (^{86}Y), Estroncio-89 (^{89}Sr) en equilibrio con Zirconio-89 (^{89}Zr), Ytrio-89m ($^{89\text{m}}\text{Y}$), Estroncio-90 (^{90}Sr) en equilibrio con Ytrio-90 (^{90}Y), Ytrio-90 (^{90}Y), Molibdeno-99 (^{99}Mo) en equilibrio con Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Tecnecio-99 (^{99}Tc), Rutenio-103 (^{103}Ru) en equilibrio con Rodio-103m ($^{103\text{m}}\text{Rh}$), Rodio-103m ($^{103\text{m}}\text{Rh}$), Indio-110 (^{110}In), Indio-110m ($^{110\text{m}}\text{In}$), Indio-111 (^{111}In), Indio-114m ($^{114\text{m}}\text{In}$) en equilibrio con Indio-114 (^{114}In), Indio-114 (^{114}In), Estaño-117m ($^{117\text{m}}\text{Sn}$), Teluro-121m ($^{121\text{m}}\text{Te}$) en equilibrio con Teluro-121 (^{121}Te), Teluro-121 (^{121}Te), Iodo-123 (^{123}I), Iodo-124 (^{124}I), Iodo-125 (^{125}I), Iodo-126 (^{126}I), Iodo-131 (^{131}I), Xenon-131m ($^{131\text{m}}\text{Xe}$), Iodo-133 (^{133}I), decae en Xenon-133, Xenon-133 (^{133}Xe), Xenon-133m ($^{133\text{m}}\text{Xe}$) (decae en Xenon-133), Yodo-135 (^{135}I) (decae en Xenon-135), Xenon-135 (^{135}Xe), Cesio-137 (^{137}Cs) en equilibrio con Bario-137m ($^{137\text{m}}\text{Ba}$), Samario-153 (^{153}Sm), Holmio-166 (^{166}Ho), Lutecio-177 (^{177}Lu), Renio-186 (^{186}Re), Renio-188 (^{188}Re), Talio-200 (^{200}Tl), Plomo-201 (^{201}Pb) (decae en Talio-201), Talio-202 (^{202}Tl), Plomo-203 (^{203}Pb), Astatio-211 (^{211}At), Bismuto-213 (^{213}Bi) en equilibrio con polonio-213 (^{213}Po), Polonio-213 (^{213}Po) y Escandio-44.

Para los nucleídos PET se pretende que se pueden seleccionar del grupo que comprende ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{110}In o ^{18}F trazador base y los nucleídos SPECT pueden ser seleccionados del grupo que comprende ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I o ^{201}Tl .

Se hace notar que los isótopos radiactivos autorizados para los estudios de **microPET**, son:

Radionucleido	Símbolo	Periodo de semidesintegración
Fluor-18	^{18}F	109,8 minutos
Carbono-11	^{11}C	20,4 minutos
Cobre-64	^{64}Cu	12,7 horas
Rubidio-82	^{82}Rb	1,3 minutos
Galio-68	^{68}Ga	67,7 minutos
Yodo-124	^{124}I	4,18 días
Bromo-76	^{76}Br	16,2 horas

5

De todos los radioisótopos disponibles el más utilizado para marcaje de diversas moléculas es el ^{18}F , ya que su acumulación indica zonas con incremento metabólico debido a un aumento de la demanda de glucosa. Además hay que considerar que su síntesis es rápida y que el tiempo de desintegración relativamente elevado del flúor-18 permite su transporte desde el centro productor. La FDG se incorpora a la célula mediante transportadores de glucosa y una vez fosforilada no puede proseguir su ruta metabólica. Por tanto queda atrapada irreversiblemente, acumulándose en mayor cantidad en aquellos tejidos con mayor consumo energético.

10

La siguiente tabla recoge los principales radiofármacos empleados en PET y sus aplicaciones.

15

Radiofármacos PET	Aplicación común
[¹⁸ F]-FDG (fluorodesoxiglucosa)	Metabolismo glucolítico (actividad tumoral, viabilidad miocárdica, actividad neuronal, inflamación...)
[¹⁸ F]-FMISO (fluoromisodinazol)	Procesos de hipoxia
[¹⁸ F]-FLT (fluorotimidina)	Proliferación celular, oncogénesis
[¹⁸ F]-NaF (fluoruro de sodio)	Estudios óseos, metástasis
[¹¹ C]-acetato	Metabolismo β-oxidativo cardiaco y procesos oncológicos
[¹³ N]-NH ₃	Perfusión miocárdica
[⁶⁸ Ga]-DOTA-péptidos	Tumores de origen neuroendocrino

Además, se hace notar que los radioisótopos empleados para los estudios de **microSPECT** son:

Radionucleido	Símbolo	Periodo de Semidesintegración
Tecnecio-99m	^{99m} Tc	6 horas
Yodo-123	¹²³ I	13,2 horas
Talio-201	²⁰¹ Tl	3,04 días
Galio-67	⁶⁷ Ga	3,26 días

- 5 Los compuestos marcados con ^{99m}Tc son los radiofármacos SPECT por excelencia. Algunos ejemplos de radiotrazadores para SPECT se exponen en la siguiente tabla:

Radiofármacos SPECT	Aplicación común
$[^{99m}\text{Tc}]$ -MDP, $[^{99m}\text{Tc}]$ -HDP, $[^{99m}\text{Tc}]$ -HEDP	Actividad osteoblástica
$[^{99m}\text{Tc}]$ -DTPA, $[^{99m}\text{Tc}]$ -DMSA	Estudios renales
$[^{99m}\text{Tc}]$ -sestamibi, $[^{99m}\text{Tc}]$ -tetrofosmin	Perfusión miocárdica
$[^{99m}\text{Tc}]$ -HMPAO, $[^{99m}\text{Tc}]$ -DMSA	Perfusión cerebral
$[^{67}\text{Ga}]$ -citrato	Inflamación

Huelga decir, que todos los radioisótopos mencionados se pueden utilizar en el contexto de la presente invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el fármaco quimioterapéutico se seleccionan de entre doxorubicina y cisplatino. Preferiblemente cisplatino.

COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la nanopartícula de la invención o el sistema de transporte de la invención tal y como se han definido previamente. En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica. En otra realización preferida, la composición es una composición cosmética. En otra realización preferida, la composición es una composición diagnóstica. En otra realización preferida, la composición es una composición teragnóstica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitarse, cualquier composición líquida (suspensión del sistema incluyendo las nanopartículas en agua o en agua con aditivos tales como viscosizantes, tampones de pH, etc.) o sólida (el sistema incluyendo las nanopartículas liofilizadas o atomizadas formando un polvo que se puede utilizar para elaborar granulados, comprimidos o cápsulas) para su administración bien por vía oral, bucal o sublingual, bien tópica, o bien en forma líquida o semisólida para su administración por vía transdérmica, ocular, nasal, vaginal o bien parenteral. En el caso de las vías no parenterales el contacto de las

nanopartículas con la piel o mucosas podrá mejorarse dotando a las partículas de una importante carga positiva, lo que favorecerá su interacción con las citadas superficies cargadas negativamente. En el caso de las vías parenterales, más en concreto para la administración intravenosa, estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la distribución *in vivo* de los fármacos o moléculas que puedan llevar asociadas. Pueden ser también suspensiones en fluidos biológicos, tales como el suero. Las suspensiones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales.

Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes microbianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz, etc.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

USOS MÉDICOS

Algunos nanosistemas como las nanopartículas de la invención, el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención o la composición de la invención, permiten el desarrollo de distintas aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento médicos. Los nanodispositivos utilizados como agentes de contraste en imagen médica (especialmente, en resonancia magnética, ecografía y tomografía) tienen claras ventajas sobre los agentes tradicionales en cuanto a su mejor dispersión óptica, incremento de la biocompatibilidad, mayor tiempo en circulación en sangre, disminución en la probabilidad de desnaturalización y, especialmente, en su capacidad de unirse a ligandos, lo cual los convierte en dispositivos con múltiples funciones para la unión selectiva a células diana, permitiendo su uso en diagnóstico por imagen *in vivo*, en la vehiculización de medicamentos y en la monitorización del tratamiento.

Así pues, el sistema de transporte o la composición de la invención, pueden emplearse para el diagnóstico *in vivo*, dirigida en la terapia *in vivo*, la visualización de la administración de fármacos o tinción de las células, los procesos y vías biológicos.

Por tanto, un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención, el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención o la composición de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a las nanopartículas de la invención, el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención o la composición de la invención para su uso en medicina.

En una realización preferida, las nanopartículas de la invención, el sistema para el transporte de moléculas biológicamente activas de la invención o la composición de la invención tiene adsorbido químicamente un radioisótopo para PET/SPECT.

Así, la composición de la invención, adicionalmente puede comprender un marcador detectable. Un “marcador detectable” se refiere a cualquier marcador que se pueda usar para localizar la composición *in vivo* o *in vitro*. Ejemplos de marcadores, pero sin limitarse a estos, se ha descrito previamente en la presente invención. La visualización puede realizarse a simple vista o mediante un aparato (como por ejemplo, pero sin limitarse a un microscopio) y puede implicar una fuente de energía o de luz.

Las técnicas de imagen molecular preclínicas en las que la presente invención resulta útil engloba técnicas tales como el microPET (tomografía por emisión de positrones) y el microSPECT (tomografía por emisión de fotón único) que permiten la representación visual, caracterización y cuantificación de procesos biológicos a nivel celular y molecular en organismos vivos sin perturbar el sistema en estudio. Para ello previamente se administra al animal un radiotrazador, marcado con isótopos emisores de fotones gamma o de positrones, adecuado a los objetivos del estudio. Estas técnicas de imagen proporcionan información molecular y funcional del tejido, caracterizándose por una elevada sensibilidad.

La técnica microCT (tomografía computerizada por rayos X) permite obtener la información morfológica (anatómica) complementaria a la información metabólica proporcionada por el microPET-microSPECT, gracias a su alta resolución espacial.

En el contexto de la presente invención, el término “prevención y/o tratamiento” no solo comprende prevenir y/o tratar la enfermedad, sino que generalmente también comprende prevenir el comienzo de la enfermedad, mostrando o revirtiendo su progresión, previniendo o mostrando el comienzo de uno más síntomas asociados a la enfermedad, reduciendo y/o aliviando dichos síntomas, reduciendo la severidad y/o la duración de la enfermedad y/o los síntomas asociados a ella y previniendo un futuro aumento de la severidad de la enfermedad y/o los síntomas asociados con ella, previniendo, reduciendo o revirtiendo los

daños fisiológicos causados por la enfermedad, y generalmente cualquier acción farmacológica que es beneficiosa para el paciente

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSPORTE DE LA INVENCION

- 5 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método para la síntesis de las NPs de la presente invención que comprende:

1. Síntesis de NPs hidrofóbicas, preferiblemente SPIONs hidrofóbicas.

A modo meramente ilustrativo se hace notar que dichas SPIONs de, por ejemplo 10 nm, esféricas, monodispersas e hidrofóbicas, se pueden producir por el método de
10 “descomposición térmica” descrito por Park et al. [Park J. et al., 2004. Nat. Mater. 3, 891-895]. Se hace notar que existen distintas variantes del método de síntesis de SPIONs por “Descomposición Térmica” y que se basan fundamentalmente en el uso de otros precursores orgánicos de hierro. Aunque también pueden cambiar el disolvente y los surfactantes usados.

- 15 Una lista de dichos posibles precursores orgánicos de hierro sería por ejemplo la siguiente:

-Complejos de hierro con ácidos grasos (en nuestro caso, usamos el “Oleato de hierro (III)”),

-Acetilacetonato de hierro (III),

-Carboxilato de hierro (III),

- 20 -Complejo de Colinacitrato-hierro (III),

-Complejo de cupferrón-hierro (III), y

-Pentacarbonilo de hierro.

Por otro lado, existen otros métodos de Síntesis que generen SPIONs hidrofóbicas distintos al método de Descomposición Térmica o cualquiera de sus variantes que también podrían
25 ser aplicables en la presente invención.

2. Síntesis de NPs compuestas (núcleo/recubrimiento), con derivados de alcoxi-silanos de silicios a partir de las NPs del paso 1 o de otras NPs idénticas o similares con dos o más alcoxi-silanos, preferiblemente a través de un procedimiento de microemulsión inversa.

Preferiblemente para la síntesis de estas partículas compuestas (núcleo/recubrimiento SPION/Sílica) se añaden secuencialmente alcoxi-silanos de interés a las SPIONs suspendidas en medio orgánico. Por ejemplo, en un matraz de fondo redondo de 250 mL y con intensa agitación magnética, a 6 mg de SPION-OA previamente suspendidas en 92.4 mL de ciclohexano se les añade lentamente 24 g de Tritón X-100, 19.2 mL de 1-hexanol y 4.09 mL de agua ultra pura (éste último se añade gota a gota para que no rompa la microemulsión de agua en aceite). Después se añadieron 0.443 mL de TEOS. Cuatro horas más tarde y una vez la mezcla está perfectamente homogénea (transparente), se añade gota a gota 1.2 mL de hidróxido amónico al 28 % y esta mezcla se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añaden 0.266 mL de TEOS y 0.117 de APTES. Tres horas después de la última adición, se procede a romper la microemulsión mediante la adición de un exceso de etanol absoluto. Las NPs SPION/Sílica producidas se separan de la mezcla por centrifugación a 9780 rcf y a 4 °C durante 10 minutos. Después las NPs SPION/Sílica se resuspenden en etanol absoluto y se vuelven a centrifugar a las mismas condiciones. Este proceso de lavado con etanol se repite al menos tres veces. Finalmente, las NPs se dejan secar en la estufa a 50-60°C durante 48 horas para permitir la condensación irreversible de la capa gruesa de sílica a la superficie de las SPIONs (núcleo).

3. Opcionalmente, se lleva a cabo una PEGilación de las NPs obtenidas en el paso 2.

A modo meramente ilustrativo, una vez sintetizadas las NPs compuestas SPION/Sílica del paso 2) se procede a la PEGilación de dichas NPs, empleando una parte de los grupos amino primarios disponibles en su superficie. A modo meramente ilustrativo este paso se puede llevar a cabo suspendiendo las NPs compuestas SPION/Sílica (core/Shell) (20 mg) del paso 2) en 5 mL de dimetilformamida (DMF). Por otro lado, se mezclaron 5 kDa CH₃O-PEG-COOH (60 mg), EDC·HCl (6 mg) y NHS (6 mg) en 5 mL de DMF, y esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la activación de los grupos ácido carboxílico del PEG. Una vez transcurrido el tiempo de activación, se mezclaron ambas disoluciones y se dejaron reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación magnética. Después, las NPs compuestas PEGiladas se purificaron mediante centrifugación (a 9780 rcf, a 4 °C, 5 minutos) y resuspensión en agua ultrapura. Este proceso de centrifugación-resuspensión en agua se repitió al menos tres veces.

4. Marcaje con radioisótopo SPECT [67Galio]-Citrato de las NPs del paso 2) o del paso 3).

A modo meramente ilustrativo, la actividad de la preparación comercial de [67Galio]-Citrato es de aproximadamente 173 MBq/mL y la concentración de NPs usada de 1 mg/mL.

Para los ensayos de marcaje, se mezclaron 100 µL de ambas disoluciones, de [67Galio]-Citrato y de las NPs correspondientes suspendidas en agua ultrapura. Después de cada tiempo a analizar, las NPs eran separadas mediante centrifugación (a 2000 rcf durante 1 min) y re-suspendidas en 0.1 M PBS a pH 7.4 para posteriormente hacerles una Cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, se utilizaba como fase estacionaria tiras cromatográficas de microfibra de vidrio impregnadas de silica gel (ITLC-SG Agilent Technologies) y como fase móvil una disolución 0.1 M de buffer citrato a pH = 6.0, y depositando 20 µL de las NPs marcadas con 67Ga ya purificadas. Finalmente, se medía su Pureza Radio-Química (PRQ) usando un radiocromatógrafo GITA Raytest Isotopenmessgeräte GmbH.

5. Marcaje con radioisótopo PET [89Zirconio]-Oxalato de las NPs del paso 2) o del paso 3).

A modo meramente ilustrativo, 50 µL de una disolución comercial de [89Zirconio]-Oxalato 1M con una actividad de 600 µCi se le añadía 150 µL de ácido oxálico 1 M, 90 µL de carbonato sódico 2 M, 1 mL HEPES 0.5 M (pH 7.3). La mezcla obtenida tiene un volumen total de 1,29 mL, con un pH ~7 y con una actividad 183 µCi.

Para los ensayos de marcaje, se mezclan 300 µL de la disolución del radioisótopo 89Zr a pH~7 con 100 µL de las NPs del paso 3) o del paso 2) (concentración de 1 mgNP/mL) suspendidas en agua ultrapura. Después de cada tiempo a analizar, las NPs eran separadas mediante centrifugación (a 2000 rcf durante 1 min), re-suspendidas en 0.1 M PBS a pH 7.4 y a continuación se hacía una Cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, se utilizaba como fase estacionaria tiras cromatográficas de microfibra de vidrio impregnadas de silica gel (ITLC-SG Agilent Technologies) y como fase móvil una disolución 0.1 M de buffer citrato a pH = 6.0, y depositando 20 µL de las NPs marcadas con 89Zr ya purificadas. Finalmente, se hacía una imagen empleando empleando una “placa de fósforo fotoestimulable” (PSP: photostimulable phosphor plate) y se cuantificaba la actividad en un contador de pozo.

6. Carga de Cisplatino en las NPs del paso 2) o del paso 3).

A modo meramente ilustrativo, se prepara una disolución acuosa de cisplatino (CP) a una concentración de 1 mg CP/mL. Por otro lado, se preparan disoluciones acuosas de las NPs correspondientes a la concentración de 1 mg NP/mL.

En un tubo eppendorf de 1 mL, se mezclan 500 μ L de la disolución acuosa de CP con 500 μ L de las NPs en agua. Esta mezcla se incuba durante 3 horas, a temperatura ambiente y con agitación mecánica constante. A continuación, las NPs cargadas con CP se separan mediante centrifugación (16100 rcf durante 5 minutos) y se resuspenden en 1 mL de PBS 0.1 M (pH 7.4). Este proceso de lavado, separación por centrifugación y resuspensión en agua, se repite al menos tres veces.

Para la determinación del contenido en CP de las NPs cargadas, se centrifuga a 16100 rcf durante 15 minutos y se elimina cuidadosamente todo el sobrenadante. Posteriormente, se lleva a cabo la digestión ácida de las NPs cargadas con CP. Para ello, al pellet resultante se le añade 200 μ L de ácido clorhídrico al 37 % y 200 μ L de agua ultrapura. Esta mezcla se sónica durante 30 minutos y se deja incubar durante 24 horas. En paralelo y como "muestra control", se digiere la misma cantidad de NPs pero sin cargar con CP. Finalmente, las muestras digeridas se diluyen con agua ultrapura hasta un volumen final de 4 mL y se procede al análisis del contenido en Platino, Hierro y Silicio de las muestras digeridas por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

7. Opcionalmente, se lleva a cabo una funcionalización (tinción) con el colorante-fluoróforo azul Cy5-NHS de las NPs obtenidas en el paso 2).

A modo meramente ilustrativo, una vez sintetizadas las NPs compuestas SPION/Sílica del paso 2) se suspenden (20 mg) en 5 mL de agua ultrapura y se ajusta el pH a 9.0 mediante la adición de NaOH 0.1 M. Por otro lado, se pesa Cy5-NHS (1 mg), se disuelve en 0.1 mL de DMSO y se añade a las NPs. Esta mezcla se deja reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, para permitir la unión química del colorante a una parte de los grupos aminos de la superficie de las NPs compuestas de esta invención. Después, las NPs compuestas funcionalizadas con Cy5 se purificaron mediante centrifugación (a 9780 rcf, a 4 °C, 5 minutos) y resuspensión en agua ultrapura. Este proceso de centrifugación-resuspensión en agua se repitió al menos tres veces. Finalmente, una vez purificadas, las NPs compuestas modificadas con Cy5 se secaron al vacío y en oscuridad para su caracterización.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la misma.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

A modo general, se hace notar que para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, que ha proporcionado las nanopartículas ejemplarizadas, hemos realizado un método de microemulsión inversa que emplea derivados alcoxi-silanos (una primera etapa sólo con TEOS, para el crecimiento de la capa de sílica, y una segunda etapa usando una mezcla 60 % de TEOS y 40 % de APTES para recubrir su superficie con grupos aminos primarios) que permite la solubilización en agua de las SPIONs obtenidas por descomposición térmica, recubriendo su superficie con una capa gruesa de sílica y con grupos amino primarios. Su parcial PEGilación, mediante una reacción de amidación con un derivado de polietilenglicol (α -methoxy- ω -carboxy PEG), ayuda a incrementar su estabilidad coloidal en medios acuosos (evitando la posible formación de enlaces de puente de hidrógeno entre nanopartículas a través de los grupos amino primario en su superficie) y su biocompatibilidad.

Ejemplo 1. Síntesis y Caracterización de NPs SPION-OA, SPION/Sílica y SPION/Sílica-PEG (núcleo/recubrimiento “core/shell”).

La **Figura 1** muestra un esquema resumen de este procedimiento. El protocolo de fabricación concreto de estas NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica-PEG se describe en el apartado titulado “MÉTODO DE LA INVENCION”. En primer lugar, NPs SPION-OA de 10 nm hidrofóbicas, esféricas y monodispersas se sintetizaron mediante el método de descomposición térmica del oleato de Hierro [Park J. et al., 2004. Nat. Mater. 3, 891-895]. La **Figura 2A** muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenida para una preparación de SPION-OA, donde se puede observar que presentan el tamaño, forma y homogeneidad deseada. Además, se estima que el diámetro medio de estas NPs es de 10.6 ± 1.2 nm (calculado a partir de la medida del diámetro de 40 nanopartículas de esta imagen de TEM). Una vez purificadas, como se describe en esta invención, las NPs SPION-OA hidrofóbicas obtenidas se convirtieron en hidrofílicas por medio de un método de microemulsión inversa con dos etapas: una primera en las que se adiciona sólo TEOS para permitir el crecimiento de la capa de sílica sobre la superficie de las SPION de 10 nm y otra, 24 horas después, adicionando simultáneamente 60 % de TEOS y 40 % de APTES para el recubrimiento de la su superficie de las NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica con grupos aminos primarios. Por lo tanto, este método produce un desplazamiento de los ligandos ácido oleico de la superficie de las NPs SPION-OA y las recubre con una capa gruesa de óxido de silicio, generando NPs compuestas SPION/Sílica de 100 nm hidrofílicas con grupos amino primarios e hidroxilo en su superficie.

Como puede observarse en la imagen TEM de las NPs compuestas obtenidas (**Figura 2B**), este proceso de microemulsión inversa aumenta el tamaño final de las partículas resultantes con una capa gruesa de sílica y mantiene tanto la forma esférica como su buena monodispersidad. También, se puede estimar que el tamaño medio de las nanopartículas compuestas SPION/Silica (núcleo/recubrimiento) obtenidas es de 94.3 ± 3.6 nm y por tanto, que el espesor medio de la capa de Sílica obtenido es de 41.9 ± 2.4 nm.

La estructura porosa de las Nanopartículas compuestas SPION/Silica obtenidas se analizó mediante la medida de su isoterma de adsorción-desorción de Nitrógeno (a 77 K; **Figura 3A**). La curva obtenida indica ausencia de microporos y presencia de mesoporos. Estas NPs compuestas SPION/Silica presentan un área de superficie-BET de 36.15 m²/g y un volumen de poro de 0.47 cm³/g, valores que fueron calculados a partir de las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [Banerjee S. et al., 2015. RSC Advances, 5, 14425-14440]. También, se llevó a cabo la caracterización superficial de las NPs SPION-OA y de las compuestas SPION/Silica resultantes de la reacción de microemulsión inversa empleando la técnica de Espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X (XPS), la cual proporciona información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes. En la **Figura 3B** se muestran los espectros generales de XPS o Survey obtenidos para ambas NPs. En el espectro XPS de las NPs SPION-OA sólo se observa la presencia de Carbono, indicando que es el elemento mayoritario en esta superficie como consecuencia del recubrimiento de las SPIONs con una elevada la cantidad de moléculas de ácido oleico. Por otro lado, en el espectro XPS obtenido para las NPs compuestas SPION/Silica se observa la aparición de elementos como el Silicio (Si), Nitrógeno (N) y Oxígeno (O). Estos resultados confirman la composición química esperada para estas NPs compuestas SPION/Silica. A continuación, y para confirmar la presencia de grupos amino primario en la superficie de las NPs compuestas obtenidas, se empleó el test de Ninhidrina que es un método colorimétrico clásico empleado para detectar aminas primarias en proteínas [Sun S.W. et al., 2006. J. Food Compos. Anal. 19, 112–117]. La **Figura 3C** muestra el espectro de absorción UV-visible obtenido después de tratar con ninhidrina una disolución acuosa de las NPs compuestas SPION/Silica (2 mg NPs en 1 mL). También, se emplearon el aminoácido L-Metionina (50 ppm, positivo) y agua (negativo) como controles del método. La formación de una coloración violeta y la Absorbancia obtenida a 570 nm confirman la presencia de grupos amino primarios en la superficie de las NPs compuestas obtenidas. A partir de los valores de Absorbancia obtenidos a 570 nm, y utilizando como referencia la L-Metionina, podemos estimar el número de grupos amino primarios en las NPs (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resumen de valores de Absorbancia obtenidos a partir de la **Figura 3C**, incremento de absorbancia (ΔA_{570}) y relación con el número de grupos amino primarios presentes en cada caso (es decir, por NP y por nm^2):

	A_{570}	ΔA_{570}	Nº Aminos	NºAminos per NP	NºAminos/ nm^2
Negative Control	0.06	-	-	-	-
50 ppm L-Metionina	0.28	0.22	$2.02 \cdot 10^{17}$	-	-
2 mg SPION/Silica	0.77	0.71	$6.52 \cdot 10^{17}$	449592*	14.3
2 mg SPION/Silica-PEG	0.51	0.45	$5.66 \cdot 10^{17}$	284827*	9.1

*Se ha considerado que la Masa teórica de un NP-Silica de 100 nm es $1.38 \cdot 10^{-15}$ g y el Área superficial teórica de una esfera de 100 nm es 31415.9 nm^2 .

5 Con el objetivo de mejorar la solubilidad y la biodistribución de las NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Silica, se llevó a cabo su PEGilación parcial [Cano M. et al., 2017. *Nanoscale* 9, 812-822]. Para esto, se indujo la unión covalente de moléculas de α -metoxi- ω -carboxilato PEG (5 KDa) a los grupos amino primario de la superficie de estas
10 partículas, mediante una reacción de amidación. Las NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Silica PEGiladas resultantes fueron fácilmente purificadas usando una simple diálisis (Membrana Biotech de Celulosa Ester (CE) con cut-off de 50 KDa). Imágenes de TEM de las NPs obtenidas (**Figura 2C**) demuestran que este proceso de
15 PEGilación no produce cambios morfológicos, ni afecta al tamaño, ni a la monodispersidad de las partículas resultantes.

A continuación, para confirmar el recubrimiento con Sílica y la posterior PEGilación, se emplearon las técnicas analíticas de espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR) y análisis Termogravimétrico (TGA) tanto de las NPs compuestas PEGiladas como de sus NPs precursoras (SPION-OA y SPION/Silica). En primer lugar, El espectro de FTIR
20 de las NPs precursoras hidrofóbicas (SPION-OA) mostraba las bandas características de vibración Fe-O del núcleo de magnetita (585 cm^{-1}), de extensión C-H (2926 y 2852 cm^{-1}) y de vibración del carboxilato (1710 y 1459 cm^{-1}) procedentes de las moléculas de ácido oleico que recubren la SPION (**Figura 4A**). El espectro FTIR de las NPs compuestas por
25 (núcleo/recubrimiento) SPION/Silica resultantes de la microemulsión inversa presentaba una banda nueva y ancha correspondiente a los enlaces Fe-O-Si (800 - 1200 cm^{-1}) y la característica de flexión N-H de las aminas primarias ($\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$), confirmando el crecimiento de la capa de sílica con TEOS y el recubrimiento con grupos aminos primarios con la mezcla de alcoxi-silanos mencionada se realizó con éxito (**Figura 4A**). El espectro de

FTIR de las NPs compuestas PEGiladas presenta la aparición de bandas débiles procedentes del polímero, como de extensión C-H (a 2968 y 2918 cm^{-1}) y del metilo (1466 cm^{-1} y 1377 cm^{-1}) (**Figura 4A**). Por otro lado, la curva de TGA obtenida para las NPs obtenidas por descomposición térmica (SPION-OA) mostraba una pérdida de peso de 74.1% , correspondiente a la considerable cantidad de ligandos de ácido oleico que recubren al núcleo de la partícula (incluida en la **Figura 4B**). La curva de TGA obtenida para las NPs compuestas SPION/Sílica presentaba una pérdida de peso de 17.2% , mucho menor que el obtenido con SPION-OA, y habitual en partículas sometidas a procesos de silanización, donde los ligandos de ácido oleico de las SPION-OA son desplazados por los derivados alcoxi-silanos [Cano M. et al., 2017. *Nanoscale* 9, 812-822; Cano M. et al., 2016. *RSC Advances* 6, 70374-70382] (**Figura 4B**). La curva de TGA obtenida para las NPs compuestas PEGiladas mostraba una pérdida de peso de 25.4% , lo que significa que hay un incremento de peso del 8.2% generado por las moléculas de PEG 5 KDa unidas covalentemente a través de un enlace peptídico a las NPs compuestas core/shell SPION/Sílica precursoras (**Figura 4B**). Los resultados de FTIR y TGA obtenidos no sólo confirman que se mantiene la capa gruesa de Sílica producida, sino que además nos indica que el proceso de PEGilación ha sido eficiente. Además, el test de Ninhidrina de estas NPs PEGiladas en comparación con las NPs sin PEGilar muestra una disminución en la absorbancia a 570 nm y por tanto una reducción del número de grupos amino primario en superficie (**Figura 3D**).

La **Figura 4C** muestra la variación del potencial-zeta (ZP) de ambas NPs compuestas core/shell SPION/Sílica, con y sin PEG, a distintos valores de pH del medio. Se puede observar que ambas NPs poseen valores positivos de ZP, confirmando nuevamente la presencia de grupos amino primarios expuestos en su superficie. Además, las curvas obtenidas (ZP frente al pH del medio) para ambas NPs compuestas tienen la forma característica mostrada para NPs de sílica modificadas en su superficie con grupos amino primarios [Zhu R. et al., 2011. *J. Mater. Chem.* 21, 5464-5474; Neumann A. et al., 2013. *RSC Adv.* 3, 24222–24230].

Para completar la caracterización físico-química de las NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica PEGiladas y de sus precursores se analizaron también sus propiedades superparamagnéticas mediante la técnica de Magnetometría de muestra vibratoria (en inglés, vibrating sample magnetometry, VSM). La representación gráfica de los valores de Magnetización (M) obtenidos frente a la variación del campo magnético aplicado (H) a 300 °K mostraba la ausencia de coercitividad y remanencia en todas las muestras, confirmando su comportamiento superparamagnético de todas estas NPs (**Figura 4D**).

Nuestros análisis revelaron que los valores de saturación de magnetización de las NPs compuestas core/Shell SPION/Sílica sin y con PEG eran de 0.57 y 0.31 Am²/kg, respectivamente, valores inferiores al obtenido para las NPs SPION-OA (22.3 Am²/kg). Estas variaciones eran debidas al diferente recubrimiento que presentaban cada una de las NPs analizadas. En cualquier caso, los valores de magnetización obtenidos eran similares al de otras NPs compuestas SPION/Silica, y por tanto apropiados también para su uso en imagen por resonancia magnética [Kim J. et al., 2008. Angew. Chem. 120, 8566 –8569; Cano M. et al., 2015. Chem. Commun. 51, 3620-3622].

Ejemplo 2. Estudios de citotoxicidad

La biocompatibilidad celular supone un factor importante a considerar en el desarrollo de las NPs para uso biomédico, por ello analizamos la citotoxicidad de nuestras NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica con y sin PEG. Para estos estudios usamos la línea celular humana HepG2 de carcinoma hepático, la cual constituye un modelo adecuado para los ensayos de citotoxicidad en estudios farmacéuticos. Además, estas células representan un buen ejemplo de diana susceptible de sufrir efectos secundarios in vivo, puesto que la mayoría de las NPs son secuestradas de forma masiva por el hígado al administrarse por vía intravenosa [Blanco E. et al., 2015. Nature Biotech. 33, 941-951].

Cuantificamos la citotoxicidad mediante la proliferación celular basándonos en la integridad de la membrana (la cual usamos como marcador de muerte celular) de las células HepG2 expuestas a concentraciones crecientes de ambas NPs compuestas durante 24 y 48 horas. Para ello, usamos dos marcadores fluorescentes con diferente permeabilidad plasmática: Hoechst 33342 para teñir los núcleos de las células totales (tinción azul en la **Figura 5D**) y ioduro de propidio (P.I) para teñir las células muertas (tinción amarilla en la **Figura 5D**), el cual sólo puede penetrar en el interior de las células cuando la integridad de su membrana está comprometida [Jan E. et al., 2008. ACS Nano 2, 928-938]. La exposición de las células a concentraciones de ambas NPs compuestas, incluso a concentraciones de 200 µg Fe·mL⁻¹, no tuvo efecto en la proliferación en comparación con las muestras control (**Figura 5A**). En consonancia con lo anterior, apenas se contabilizaron células teñidas con P.I., es decir, muertas, aunque la aparición de éstas fue dependiente de la concentración de NPs administrada y por tanto ligeramente mayor con las concentraciones mayores (**Figura 5B**). Así, la concentración de células muertas en comparación con las células totales fue en todos los caso inferior al 3% (**Figura 5C**). Estos resultados demuestran que ambas NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica, con y sin PEG, son biocompatibles incluso a concentraciones de hierro de 200 µg. mL⁻¹ y a 48 horas de incubación, lo cual

corroborar su potencial uso en aplicaciones biomédicas [Singh N. et al., 2010. Nano Reviews 1, 1-15].

Ejemplo 3. Estudios de MRI (in vitro e in vivo)

5 Evaluamos el potencial de ambas NPs compuestas por (núcleo/recubrimiento) SPION/Sílica, con y sin PEG, como agentes de contraste para MRI. Para ello analizamos los tiempos de relajatividad longitudinal (T1) y transversal (T2) a campo magnético bajo (1.5 T) y alto (9.4 T), usando un relaxómetro y un escáner MRI preclínico respectivamente (**Tabla 2**).

Tabla 2. Propiedades de relajatividad de las NPs compuestas core/Shell SPION/Sílica, con y sin PEG, a campo bajo (1.5 T) y alto (9.4 T).

		Relajación Longitudinal	Relajación Transversal	
NPs	Field	r_1 [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]	r_2 [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$]	r_2/r_1
SPION/Sílica	1.5 T	3.31 ± 0.06	165.1 ± 3.7	49.88
	9.4 T	1.02 ± 0.04	109.2 ± 4.1	107.1
SPION/Sílica-PEG	1.5 T	1.55 ± 0.03	214.2 ± 5.1	138.2
	9.4 T	1.10 ± 0.02	138.7 ± 3.6	126.1

10

El promedio de la relajatividad transversal (r_2) de las NPs compuestas SPION/Sílica sin PEGilar fue 165.1 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 1.5 T y 109.2 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 9.4 T. Mientras que para las NPs SPION/Sílica PEGiladas fue 214.2 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 1.5 T y 138.7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 9.4 T. Además, la medida de la relajatividad longitudinal (r_1) de las NPs compuestas sin PEGilar fue 3.31 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 1.5 T y 1.02 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 9.4 T, dando unos ratios r_2/r_1 de 49.88 y 107.1 a dichos campos magnéticos respectivamente. Mientras que para las NPs compuestas PEGiladas fue de 1.55 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 1.5 T y 1.10 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 9.4 T, dando unos ratios r_2/r_1 de 138.2 y 126.1 a dichos campos magnéticos respectivamente. Estos valores altos de r_2/r_1 para ambas NPs compuestas SPION/Sílica (con y sin PEG) indican sus buenas propiedades de contraste T2-MRI tanto en condiciones preclínicas (alto campo magnético) como para condiciones

20

clínicas (bajo campo magnético) [Pernía M. et al., 2015. *Nanoscale* 7, 2050-2059; Cano M. et al., 2016. *RSC Advances* 6, 70374-70382; Weissleder R. et al., 2010. *People's Medical Publishing House – USA Global Medical Publisher* 1-1357]. Para verificar dichas propiedades como agente de contraste T2-MRI, se llevó a cabo un phantom de MRI a campo alto usando diferentes concentraciones de ambas NPs compuestas, SPION/Sílica y SPION/Sílica-PEG disueltas en agua (**Figura 6**). Las imágenes obtenidas confirman el buen contraste negativo (T2) que ofrecen estas NPs, incluso a las concentraciones más bajas comparándolo con el control (agua) (imágenes T2W en **Figura 6**). También se observó que el contraste T2-MRI obtenido para las NPs compuestas PEGiladas era ligeramente mayor que el mismo obtenido con las NPs SPION/Sílica sin PEGilar para una misma concentración de hierro, lo cual concuerda con sus valores $r2/r1$ a campo alto (**Tabla 2**). Por otro lado, como era de esperar, ningunas de las NPs compuestas mostraron contraste positivo (T1) comparando con su control de agua (imágenes T1W en **Figura 6**).

Como un estudio preliminar de la capacidad de las NPs compuestas PEGiladas como agente de contraste T2-MRI in vivo y de su posible acumulación pasiva en tumores por efecto EPR (“the enhanced permeability and retention effect”), se testaron en un modelo de ratón de cáncer de mama. Para ello, se implantaron subcutáneamente un millón de células 4T1.2 en ratones BALB/c y a lo largo del tiempo se desarrolló un tumor. Cuando éste alcanzó un diámetro de aproximadamente 10 mm se realizaron los estudios de MRI in vivo. Para ello se inyectaron 45 mg SPION/Sílica-PEG/Kg por vía intravenosa a través de la vena caudal de la cola (**Figura 7**). De forma general, cualquier NP administrada sistémicamente en animales se queda retenida en el hígado y en el bazo en gran proporción [Blanco E. et al., 2015. *Nature Biotech.* 33, 941- 951; Kettiger H. et al., 2013. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3255-3269; Albanese A. et al., 2012. *25 Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14, 1-16]. A la espera de resultados más concluyentes, en este estudio preliminar, apenas se apreció contraste T2 en el hígado. En cambio, en uno de los dos ratones testados, tras la administración i.v. de las NPs SPION/Sílica-PEG, se observó un oscurecimiento del tumor correspondiente a un decaimiento de la señal T2. Este prometedor resultado indicativo de la acumulación de estas NPs en el tumor, pone de manifiesto su potencial uso como agentes de contraste T2-MRI para el diagnóstico tumoral.

Ejemplo 4. Estudios de marcaje con radioisótopo SPECT [67Galio]-Citrato.

Se evaluó la capacidad intrínseca de ambas NPs compuestas SPION/Sílica, con y sin PEG, para adsorber químicamente el radioisótopo 67-Ga, el cual es un emisor de radiación gamma de varias energías y tiene un tiempo de semidesintegración de 77.8 horas. En

5 medicina nuclear se emplea el citrato de galio-67 como elemento trazador para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias o infecciosas activas, tumores y abscesos ya que se acumula en los tejidos que sufren dichas patologías [Nishiyama Y. et al., 2006. J. Nucl. Med. 47, 1571-1576; Othman M.F. et al., 2017. Nuclear Medicine and Biology 46, 12-18].

10 Para los estudios de cinética de carga de ambas NPs con citrato de galio-67 se empleó el método convencional de cromatografía en capa fina (Thin-layer chromatography, TLC) [Peñuelas Sánchez I. et al., 2001. Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol. 20, 477-498]. Este sistema de separación nos permite cuantificar la proporción de radiofármaco unido a las NPs (que quedaría en el origen de la columna de TLC) del no unido (que migraría con la fase móvil al frente del disolvente en la columna TLC). La **Figura 8A** muestra los cromatogramas obtenidos a distintos tiempos de incubación de ambas NPs (SPION/Silica y SPION/Silica-PEG) con citrato de galio-67. Como control de nuestro sistema se realizó una medida de citrato de galio-67 sin NPs (**Figura 8B**). A partir de las radio-TLCs obtenidas a distintos
15 tiempos de incubación para cada una de las NPs, se llevó a cabo la cuantificación de su pureza radioquímica (%) (**Figura 8C**). En dicha figura se observa que, a mayor tiempo de incubación, se produce mayor incremento del radiofármaco unido a las NPs. Aunque la cinética de carga es distinta en ambas NPs, transcurridas 48 horas de incubación, ésta termina siendo muy similar. Este resultado demuestra claramente la capacidad que tienen
20 ambas NPs compuestas, con y sin PEG, para adsorber fuertemente el radioisótopo 67-Ga en su superficie.

Posteriormente se evaluó la estabilidad a lo largo del tiempo de ambas NPs compuestas cargadas con 67-Ga en presencia de sales y de proteínas séricas. Para ello, en primer lugar las NPs se incubaron con citrato de galio-67 durante 3 horas y después se separaron por
25 centrifugación (a 2000 rcf durante 1 min). A continuación, las NPs cargadas con 67-Ga se resuspendieron en una disolución acuosa 0.1 M de PBS o en FBS, ambas a pH 7.4. Finalmente, se midieron sus radio-TLCs a las 3, 24 y 48 horas post-marcaje. Tanto en PBS (**Figura 9A y 9B**) como en FBS (**Figura 9C y 9D**), las NPs cargadas con 67-Ga no liberaron prácticamente nada del radiofármaco a lo largo del tiempo. Por lo tanto, este resultado valida
30 la capacidad de carga y el potencial uso de estas NPs compuestas como nanotrazadores multimodales MRI/SPECT.

Ejemplo 5. Estudios de marcaje con radioisótopo PET [89Zirconio]-Oxalato.

Se evaluó la capacidad intrínseca de ambas NPs compuestas core/shell SPION/Silica, con y sin PEG, para adsorber químicamente el radioisótopo 89-Zr, el cual decae en un 23% por

emisión de positrones, se descompone por desintegración β^+ y tiene un tiempo de semidesintegración de 78,41 horas. En medicina nuclear se emplea como trazador PET para el estudio farmacocinético de macromoléculas [Zhang Y. et al., 2011. Curr. Radiopharm. 4, 131-139; Miller L. et al., 2014. Nanoscale 6, 4928-4935].

5 Para los estudios de cinética de carga de ambas NPs con oxalato de zirconio-89 se empleó el método convencional de cromatografía en capa fina (Thin-layer chromatography, TLC) [Peñuelas Sánchez I. et al., 2001. Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol. 20, 477-498]. Este sistema de separación nos permite cuantificar la proporción de radiofármaco unido a las NPs (que quedaría en el origen de la columna de TLC) del no unido (que migraría con la fase
10 móvil al frente del disolvente en la columna TLC), es decir, midiendo independientemente su actividad con un contador de pozo. La **Figura 10A** muestra imágenes de PSP de los cromatogramas obtenidos a distintos tiempos de incubación de ambas NPs (SPION/Silica y SPION/Silica-PEG) con oxalato de zirconio-89. Como control de nuestro sistema se realizó una medida de oxalato de zirconio-89 sin NPs. A partir de las radio-TLCs obtenidas a
15 distintos tiempos de incubación para cada una de las NPs, se llevó a cabo la cuantificación de su pureza radioquímica (%) (**Figura 10B**). En dicha figura se observa que, a mayor tiempo de incubación, se produce mayor incremento del radiofármaco unido a las NPs. Aunque la cinética de carga es distinta en ambas NPs, transcurridas 48 horas de incubación, ésta termina siendo similar. Este resultado demuestra claramente la capacidad que tienen
20 estas NPs, con y sin PEG, para adsorber fuertemente 89-Zr en su superficie sin necesidad de emplear agentes quelantes.

Posteriormente se evaluó la estabilidad a lo largo del tiempo de ambas NPs cargadas con 89-Zr en presencia de sales. Para ello, en primer lugar las NPs se incubaron con oxalato de zirconio-89 durante 24 horas y después se separaron por centrifugación (a 2000 rcf durante
25 1 min). A continuación, las NPs cargadas con 89-Zr se resuspendieron en una disolución acuosa 0.1 M de PBS a pH 7.4. Finalmente, se midieron sus radio-TLCs a las 3, 24 y 48 horas post-marcaje (**Figura 10C y 10D**). Suspendidas en PBS las NPs cargadas con 89-Zr no liberaron prácticamente nada del radiofármaco a lo largo del tiempo. Por lo tanto, este resultado valida el potencial uso de estas NPs como nanotrazadores multimodales MRI/PET.

30 **Ejemplo 6. Estudios de carga de fármaco antineoplásico Cisplatino.**

La capacidad intrínseca de estas NPs compuestas core/shell SPION/Silica para la adsorción química de radioisótopos metálicos puede ser empleada también para la carga de fármacos quimioterapéuticos basados en metales. Para ilustrar esta capacidad se ha empleado el Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP), un medicamento basado en el platino y

usado en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que se incluyen sarcomas, algunos carcinomas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario), linfomas y tumor de células germinales. Complejos similares a éste basados en el platino (Pt) reaccionan in vivo, uniéndose al ADN celular y causando la apoptosis de la célula (muerte celular programada) [Duan X. et al., 2016. WIREs Nanomed. Nanobiotechnol. 8, 776-791; Comenge J. et al., 2012. PLoS One 7, e47562].

La **Figura 11** muestra los valores medios de Cisplatino adsorbido sobre ambas NPs compuestas core/shell SPION/Silica, con y sin PEG, los cuales eran de 0.082 y 0.053 mmol Pt/g NP respectivamente. Considerando que la masa de una NP de Sílica de 100 nm es aproximadamente de $1.38 \cdot 10^{-15}$ g, se puede estimar que cada NP compuesta sin PEGilar adsorbe unas 70000 moléculas de Cisplatino mientras que las NPs compuestas PEGiladas unas 45000 moléculas de este mismo fármaco quimioterapéutico. Este resultado demuestra claramente la capacidad intrínseca de estas NPs, con y sin PEG, para adsorber fuertemente Cisplatino en su superficie y por tanto su potencial uso terapéutico.

15 **Ejemplo 7. Funcionalización con Cy5 de las NPs compuestas de esta invención para su uso potencial como agente de contraste trimodal (MRI/Óptico/PET o SPECT) en la detección Ganglio Centinela para Cirugía Oncológica de Mama.**

Cuando las células cancerosas se separan del tumor primario (original) y circulan a través de la linfa o la sangre hasta otros lugares del cuerpo, se puede formar otro tumor (secundario). Este proceso se llama metástasis. El sistema linfático drena linfa desde la mama a los ganglios linfáticos de la axila. Con el fin de determinar el potencial de propagación del cáncer de mama, es esencial examinar estos ganglios para ver si hay células cancerosas. Cuando el ganglio centinela no presenta células tumorales podemos presumir que en el resto de los ganglios axilares no existirá afectación. Para identificar el o los ganglios linfáticos centinelas, se inyecta una sustancia radioactiva, un tinte azul o ambos en el espacio subareolar o cerca del tumor. La sustancia o tinte viaja a través de los conductos linfáticos hasta el ganglio o los ganglios centinelas. El mismo día de la intervención se le realizará una linfogammagrafía para comprobar que el o los ganglios se han marcado. Después, el cirujano en quirófano realizará una pequeña incisión en la axila para para detectar y extraer el ganglio centinela usando un sistema de detección (sonda gamma). Posteriormente se extraen sólo aquellos ganglios marcados con la sustancia radioactiva o tinte y el equipo de Anatomía Patológica analiza y determina si hay células cancerosas o no.

Previamente hemos demostrado las propiedades intrínsecas de las NPs compuestas SPION/Silica descritas en esta invención para adsorber químicamente radioisótopos metálicos de SPECT (Ga-67) y de PET (Zr-89). En este estudio se pretende demostrar la posibilidad de teñir estas NPs de color azul mediante su funcionalización con el colorante-fluoróforo comercial Cy5 que es muy empleado en nanomedicina (**Figura 12A y 12B**), de manera que se puede integrar y concentrar en un solo material todas las sustancias de contraste necesarias (tinte azul, fluorescencia, sustancia radioactiva, agente de contraste T2-MRI, etc.) que habría que inyectar a un paciente para la detección del ganglio centinela. Para confirmar la unión eficiente del fluoróforo a las NPs se compararon los espectros de absorción y emisión en la región UV-visible del Cy5 libre (línea azul) y de las NPs antes (línea negra) y después de la conjugación de este fluoróforo (línea roja en **Figura 12C y 12D**). Estos resultados demuestran que las NPs compuestas de esta invención pueden ser fácilmente teñidas de color azul, lo que permite la posibilidad de añadir propiedades adicionales de interés clínico a éstas, y, en este ejemplo concreto, como agente de contraste tri- o tetra-modal (MRI/Óptica/PET o SPECT).

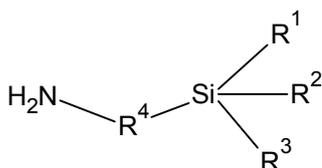
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende nanopartículas caracterizadas porque:

- 5 a. tienen un núcleo superparamagnético con un diámetro medio de 10.6 +/- 1.2 nm (calculado a partir de imágenes de TEM),
- b. presentan una superficie con grupos aminos primarios (R-NH₂) derivados de silano con un espesor medio de silica de 41.9 +/- 2.4 nm (calculado a partir de imágenes de TEM) y un número de grupos aminos derivados de silano superior a 2.8×10^5 , preferiblemente de aproximadamente +/- 30 % de 4.5×10^5 (calculado a partir del método de la Ninhidrina);
- 10 c. ausencia de microporos y presencia de mesoporos con un diámetro medio comprendido entre los 1 y 50 nm, y un área de superficie-BET de +/- 20% 36.15 m²/g y un volumen de poro de +/- 20% de 0.47 cm³/g, valores calculados a partir de las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (calculado a partir de las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno).
- 15

2. La composición de acuerdo a la reivindicación 1, donde los grupos aminos primarios (R-NH₂) derivados de silano son de formula I:

20



Formula I

donde

R1, R2 y R3 se seleccionan indistintamente de -OCH₃, -OCH₂-CH₃, -OCH₂-CH₂- y CH₃; y

25 R4 se selecciona de la lista que consiste en: -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, y -CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-.

3. La composición de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde las nanopartículas están funcionalizadas con PEG (polietilenglicol).

4. Sistema de transporte que, no presenta un agente quelante, que comprende:

- una nanopartícula tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2;
- un agente marcador; y/o
- un compuesto biológicamente activo, preferiblemente un agente terapéutico.

5.- El sistema de transporte según la reivindicación 4, donde el agente marcador se selecciona de la lista que consiste en: un radioisótopo, fluoróforo, fosforescente, quimioluminiscente y bioluminiscente.

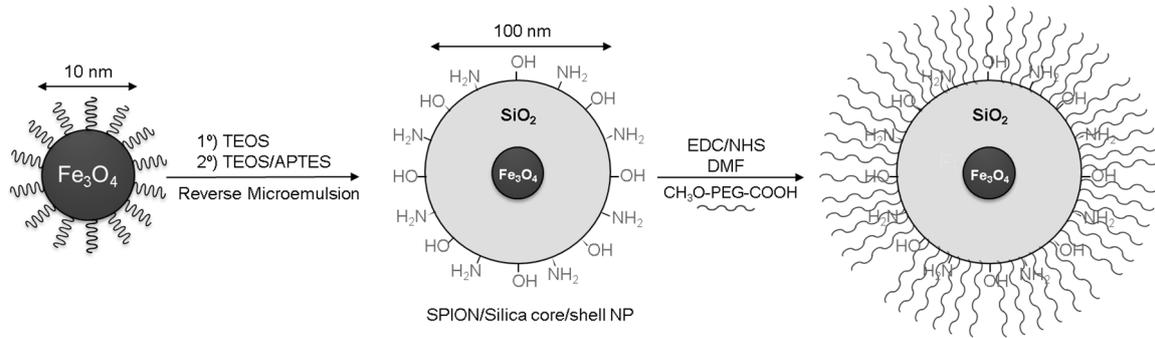
6.- El sistema de transporte según la reivindicación 5, donde el marcador es un radioisótopo y dicho radioisótopo es un PET/SPECT seleccionado de la lista que consiste en: (Tritio (^3H), Carbono-11 (^{11}C), Nitrógeno-13 (^{13}N), Oxígeno-15 (^{15}O), Flúor-18 (^{18}F), Fósforo-32 (^{32}P), Fósforo-33 (^{33}P), Azufre-35 (^{35}S), Cobalto-56 (^{56}Co), Cobalto-57 (^{57}Co), Cobalto-58 (^{58}Co), Cobalto-60 (^{60}Co), Cromo-51 (^{51}Cr), Cobre-62 (^{62}Cu), Cobre-64 (^{64}Cu), Galio-66 (^{66}Ga), Galio-67 (^{67}Ga), Germanio-68 (^{68}Ge) en equilibrio con Galio-68 (^{68}Ga), Rubidio-81 (^{81}Rb) en equilibrio con Galio-68 (^{68}Ga), Rubidio-81 (^{81}Rb) en equilibrio con Krypton-81m ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), Krypton-81m ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), Itrio-86 (^{86}Y), Estroncio-89 (^{89}Sr) en equilibrio con Zirconio-89 (^{89}Zr), Ytrio-89m ($^{89\text{m}}\text{Y}$), Estroncio-90 (^{90}Sr) en equilibrio con Ytrio-90 (^{90}Y), Ytrio-90 (^{90}Y), Molibdeno-99 (^{99}Mo) en equilibrio con Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Tecnecio-99 (^{99}Tc), Rutenio-103 (^{103}Ru) en equilibrio con Rodio-103m ($^{103\text{m}}\text{Rh}$), Rodio-103m ($^{103\text{m}}\text{Rh}$), Indio-110 (^{110}In), Indio-110m ($^{110\text{m}}\text{In}$), Indio-111 (^{111}In), Indio-114m ($^{114\text{m}}\text{In}$) en equilibrio con Indio-114 (^{114}In), Indio-114 (^{114}In), Estaño-117m ($^{117\text{m}}\text{Sn}$), Teluro-121m ($^{121\text{m}}\text{Te}$) en equilibrio con Teluro-121 (^{121}Te), Teluro-121 (^{121}Te), Iodo-123 (^{123}I), Iodo-124 (^{124}I), Iodo-125 (^{125}I), Iodo-126 (^{126}I), Iodo-131 (^{131}I), Xenon-131m ($^{131\text{m}}\text{Xe}$), Iodo-133 (^{133}I), decae en Xenon-133), Xenon-133 (^{133}Xe), Xenon-133m ($^{133\text{m}}\text{Xe}$) (decae en Xenon-133), Yodo-135 (^{135}I) (decae en Xenon-135), Xenon-135 (^{135}Xe), Cesio-137 (^{137}Cs) en equilibrio con Bario-137m ($^{137\text{m}}\text{Ba}$), Samario-153 (^{153}Sm), Holmio-166 (^{166}Ho), Lutecio-177 (^{177}Lu), Renio-186 (^{186}Re), Renio-188 (^{188}Re), Talio-200 (^{200}Tl), Plomo-201 (^{201}Pb) (decae en Talio-201), Talio-202 (^{202}Tl), Plomo-203 (^{203}Pb), Astat-211 (^{211}At), Bismuto-213 (^{213}Bi) en equilibrio con polonio-213 (^{213}Po), Polonio-213 (^{213}Po) y Escandio-44.

7.- El sistema de transporte según la reivindicación 4, donde dicho sistema comprende un fármaco quimioterapéutico seleccionado de entre cisplatino y doxorubicina.

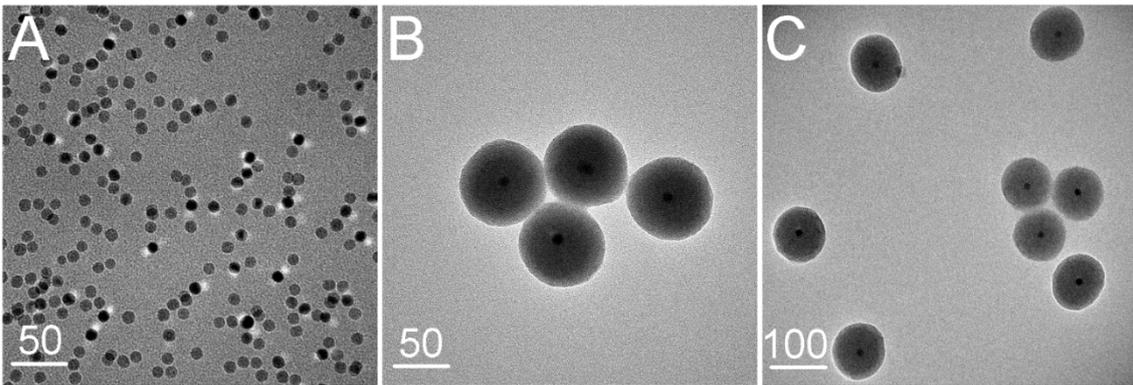
8.- Una composición que comprende el sistema de transporte según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

- 9.- Una composición según la reivindicación anterior o según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia o para su uso en el diagnóstico *in vivo*.
- 10.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 11. Procedimiento de obtención de las nanopartículas (NPs) de la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- a. Síntesis de NPs SPIONs hidrofóbicas, por el método de la descomposición térmica; y
 - b. Síntesis de NPs compuestas (núcleo/recubrimiento) SPION/sílica, con derivados
10 de alcoxi-silanos de silicio, a partir de las NPs del paso 1, a través de un procedimiento de microemulsión inversa.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde dichos derivados de alcoxi-silano de silicio son de fórmula I, tal y como se ha definido esta fórmula en la reivindicación 2.
13. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 donde
15 adicionalmente se lleva a cabo una PEGilación de las NPs obtenidas.
14. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde adicionalmente se marca la nanopartícula con un radioisótopo o un marcador.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho radioisótopo es el [67Galio]-Citrato.
- 20 16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho radioisótopo es el [89Zirconio]-Oxalato.
17. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde adicionalmente se marca la nanopartícula con un agente terapéutico.
18. El procedimiento de acuerdo a la reivindicación 17, donde dicho fármaco es el cisplatino.
- 25 19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho marcador es el colorante-fluoróforo azul Cy5-NHS.
20. Nanopartícula obtenida u obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19.

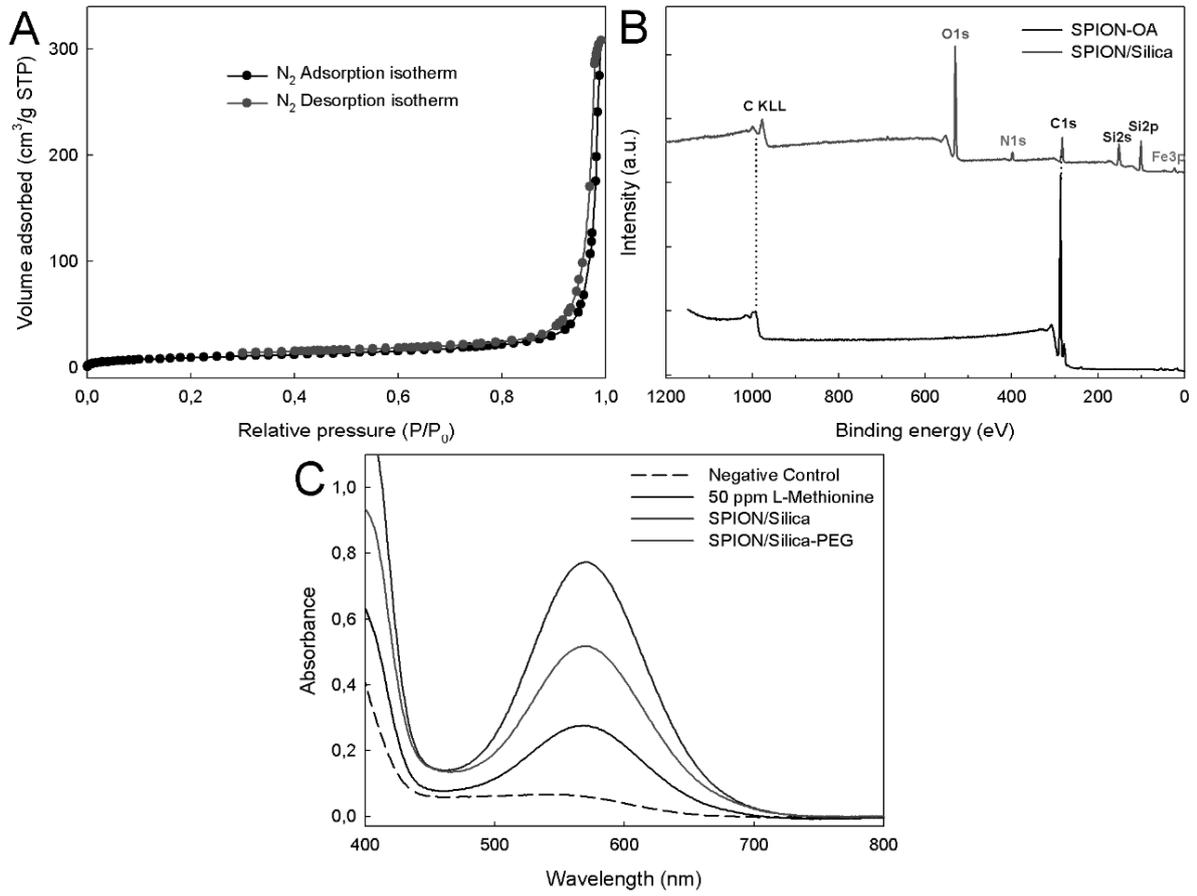
<Figura 1>



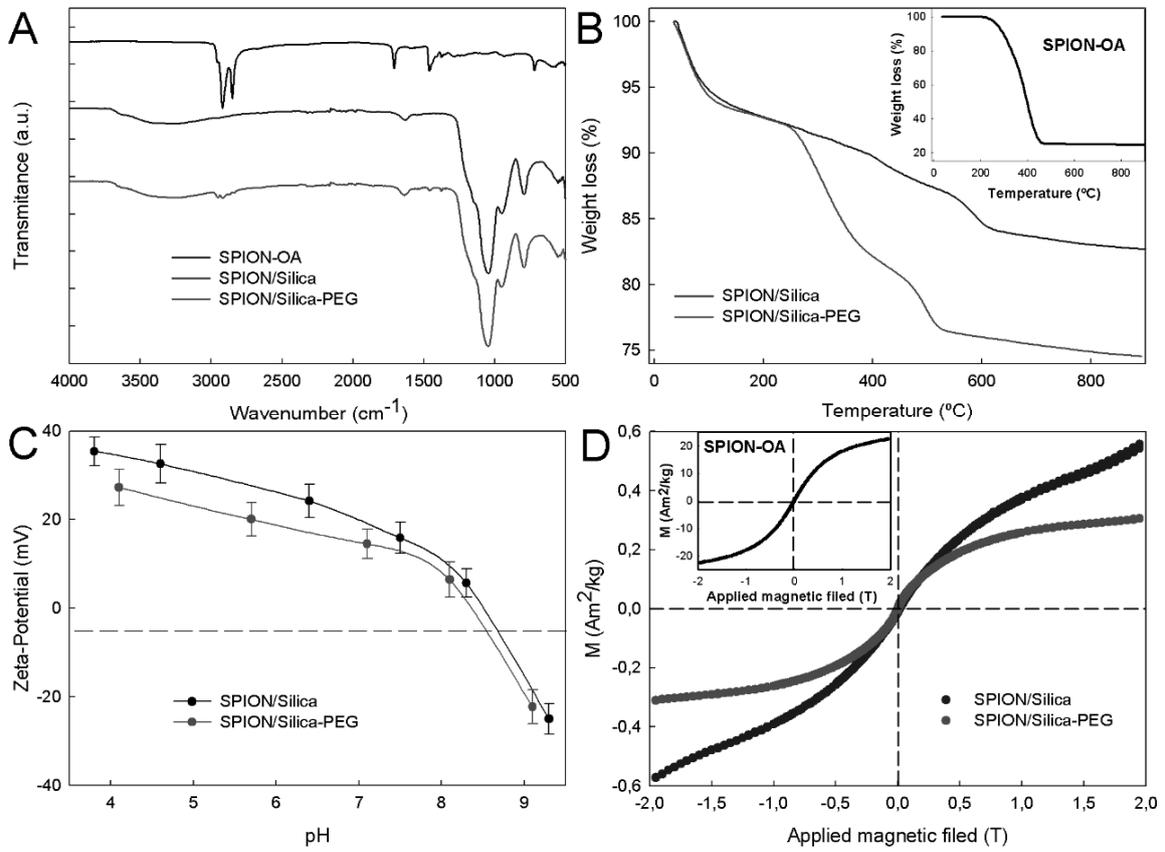
<Figura 2>



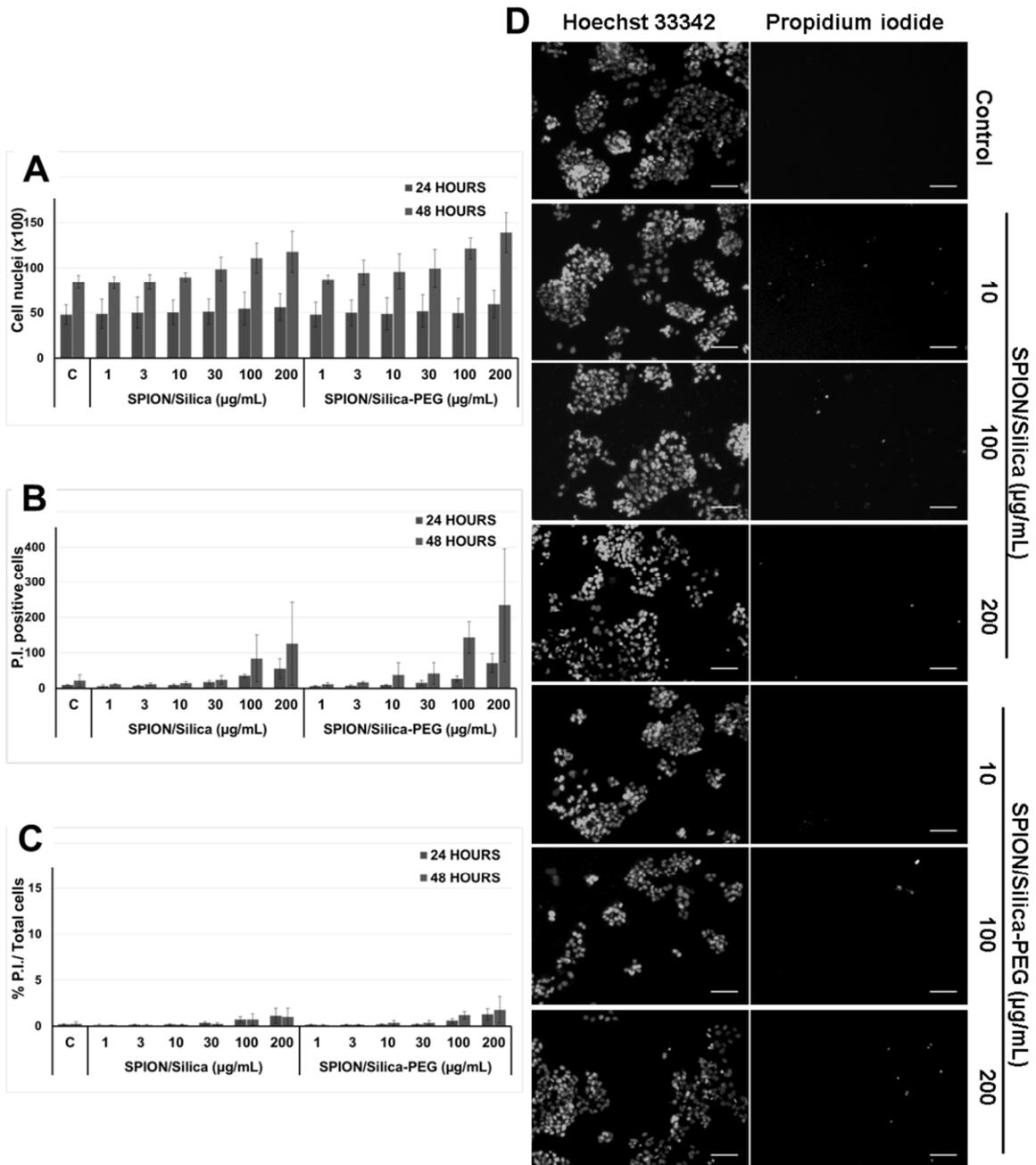
<Figure 3>



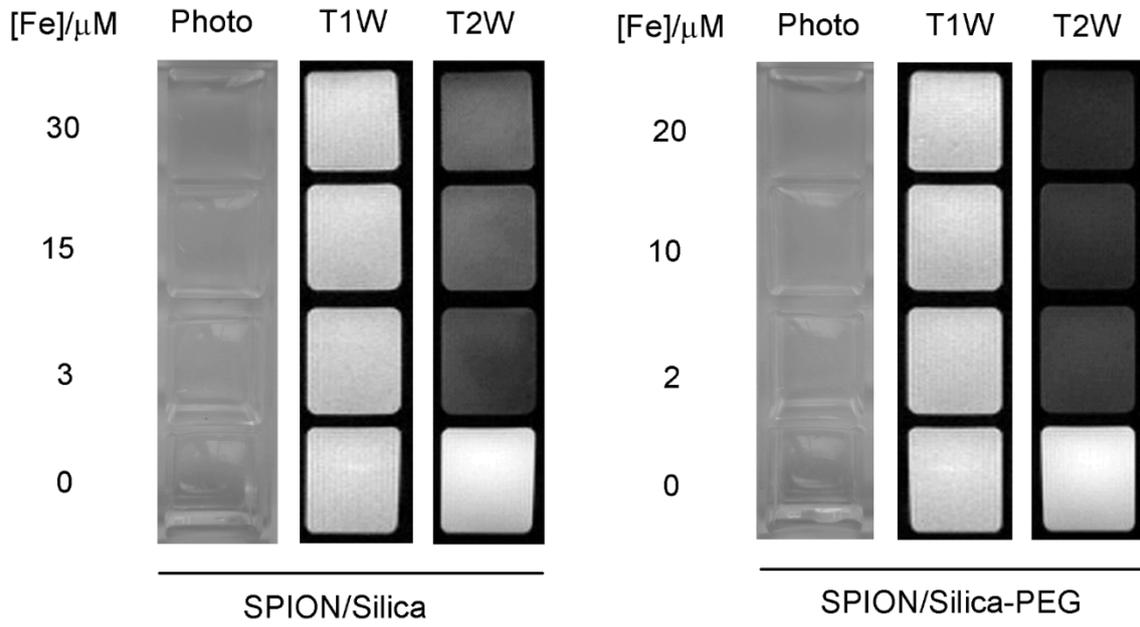
<Figura 4>



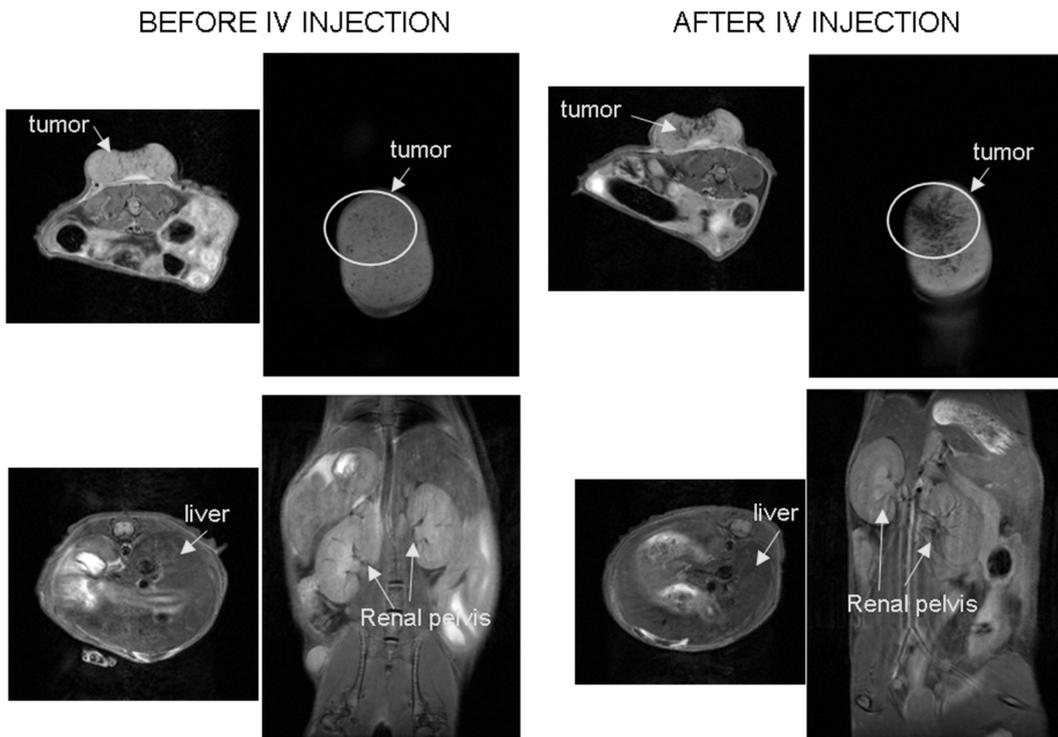
<Figura 5>



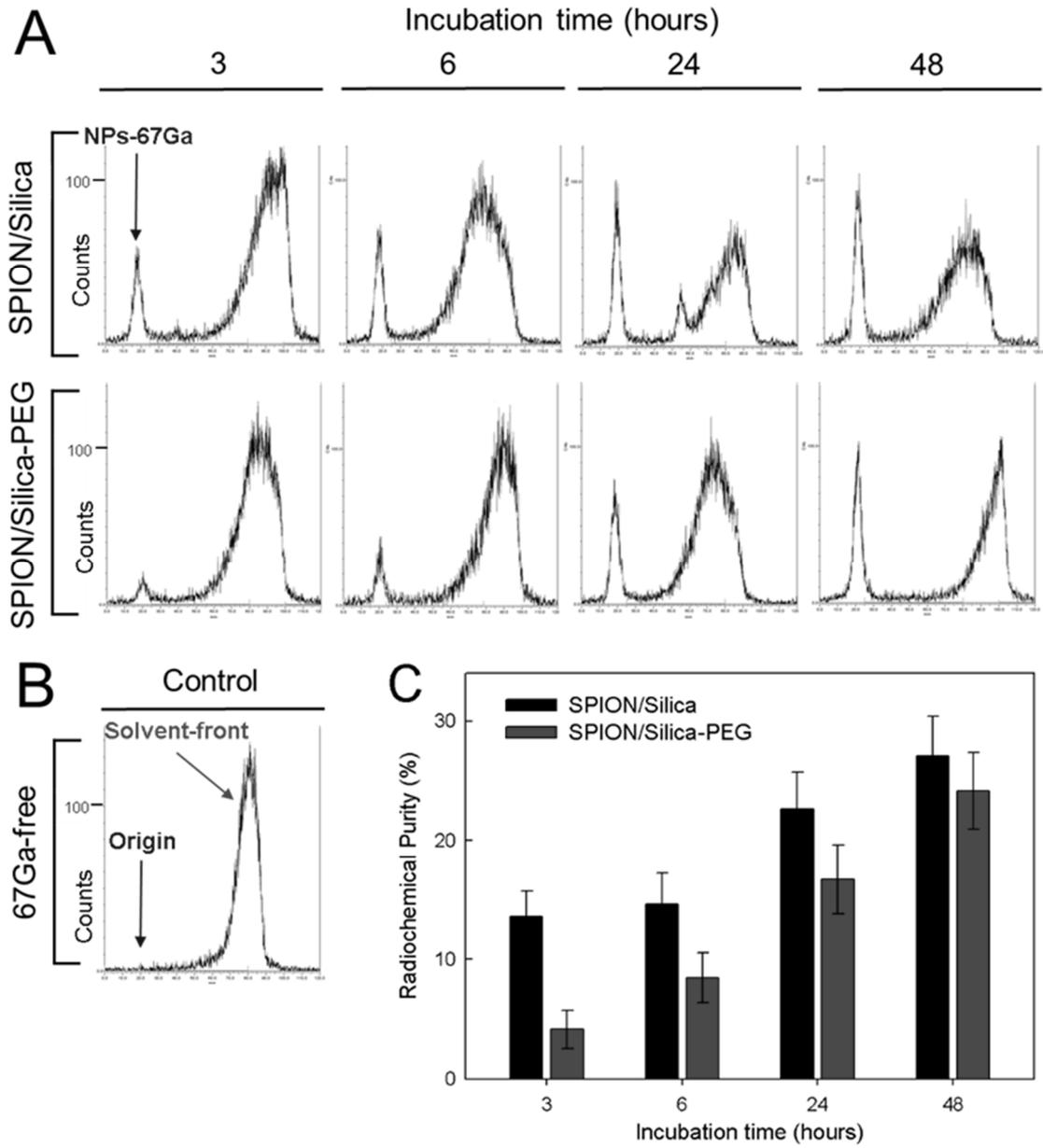
<Figura 6>



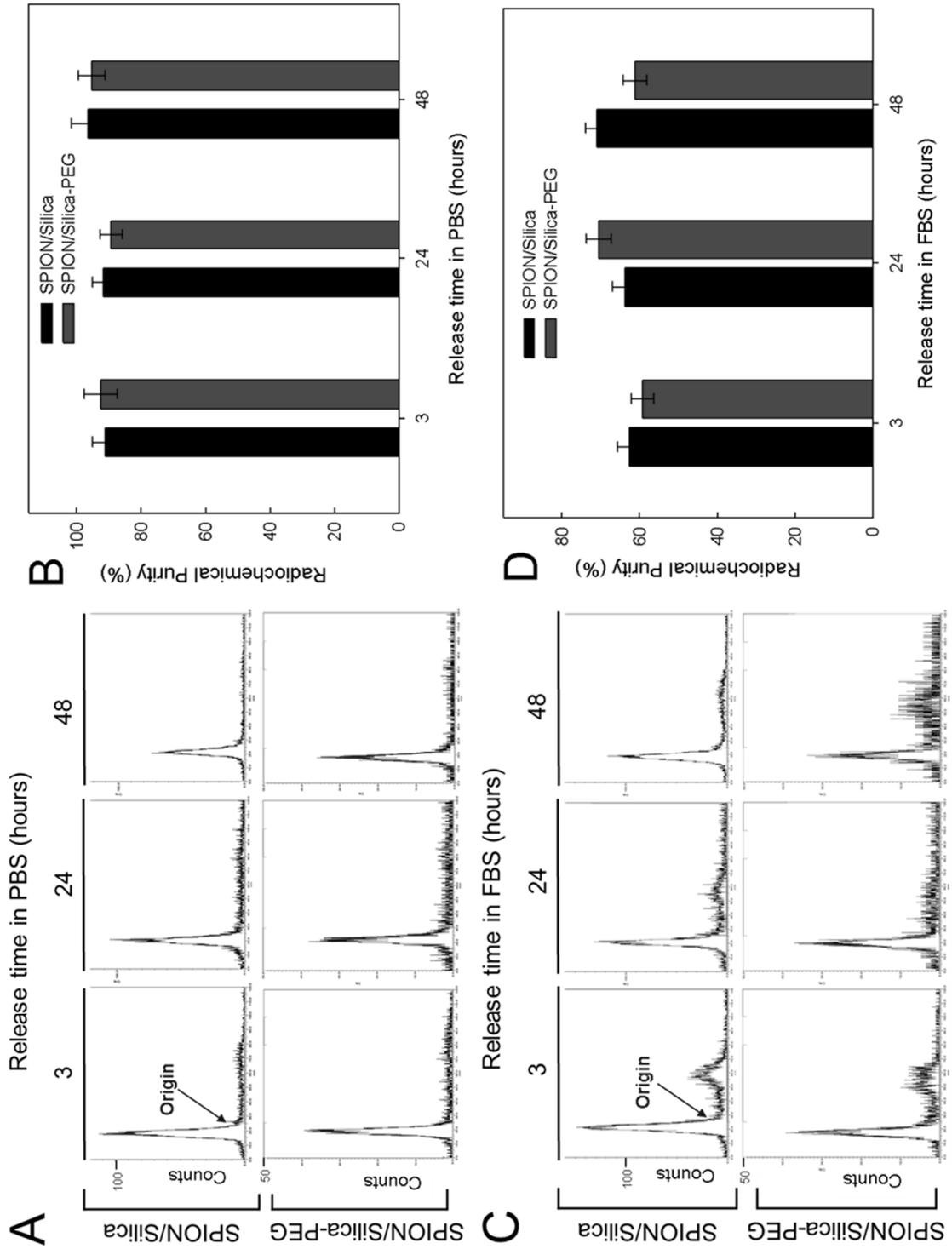
<Figura 7>



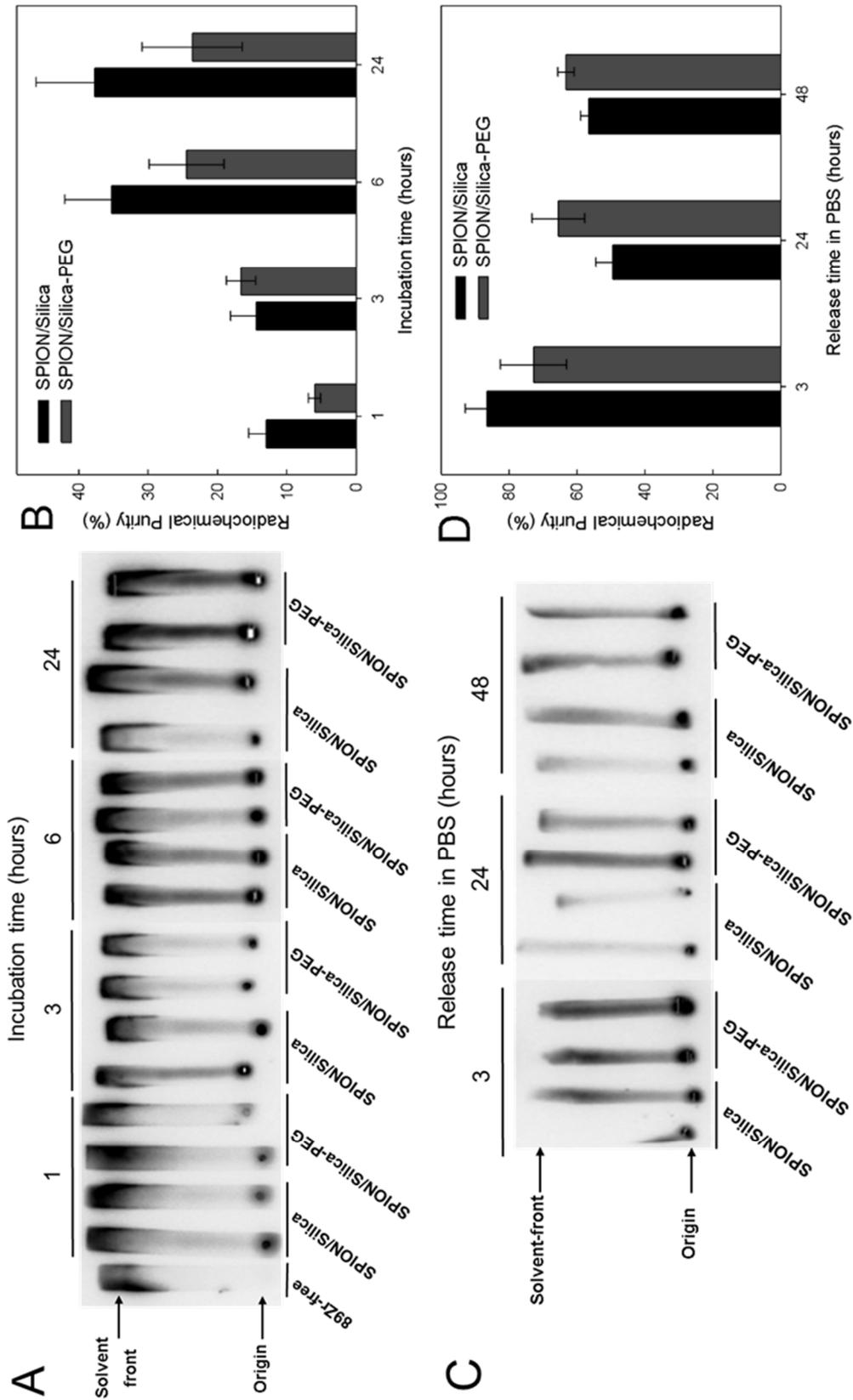
<Figure 8>



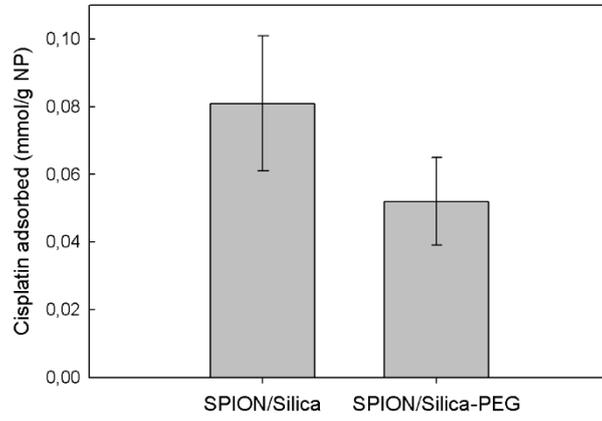
<Figure 9>



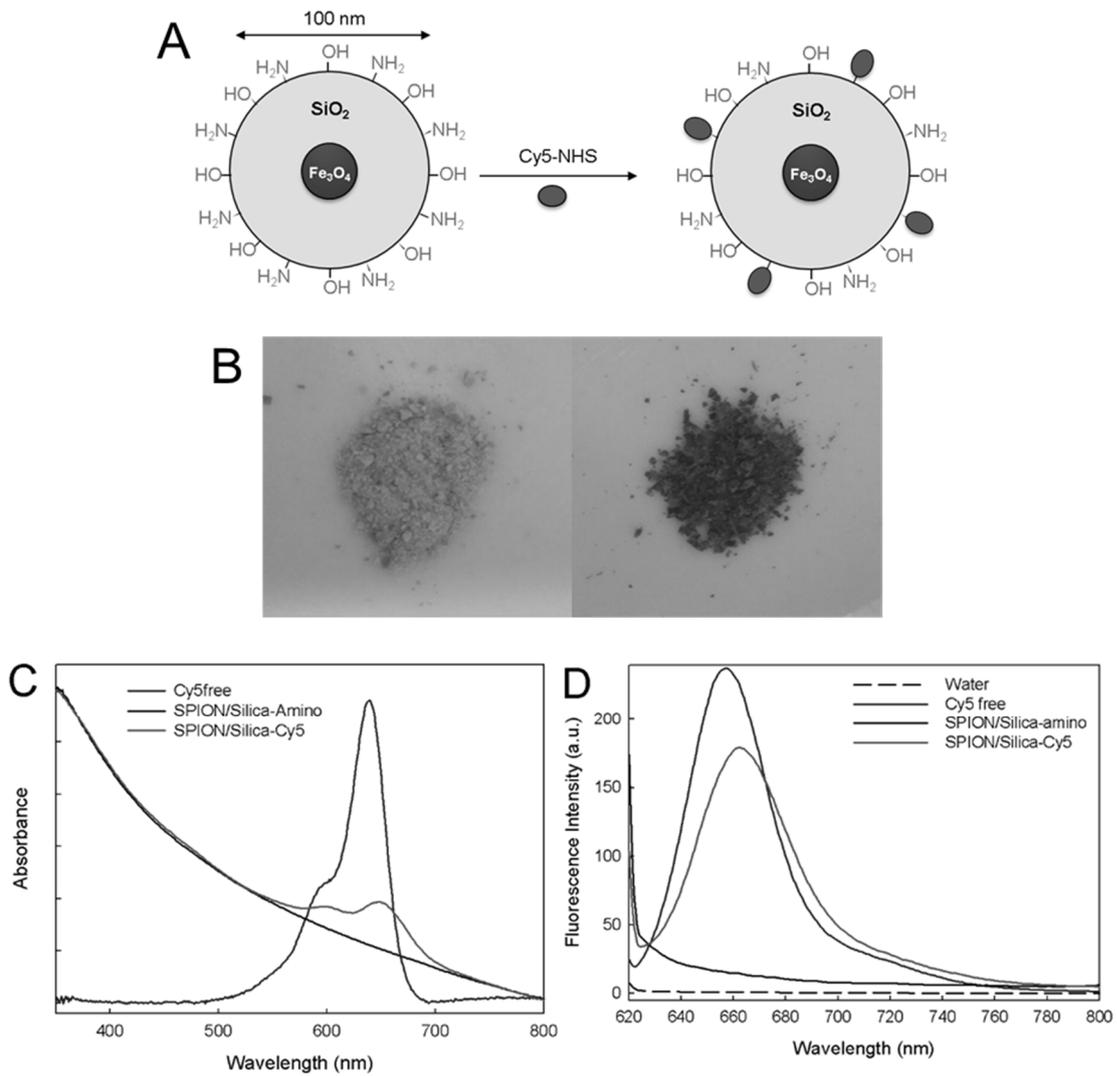
<Figure 10>



<Figura 11>



<Figura 12>





②① N.º solicitud: 201730941

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.07.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2010008862 A1 (FU AIHUA et al.) 14/01/2010, Párrafos 4, 54-56, 65, 66, 81, 94, 95, 105, 152 y 153; reivindicaciones 1-17.	1-5, 8-17, 19, 20
Y		6
Y	BURKE B P et al. "Chelator free gallium-68 radiolabelling of silica coated iron oxide nanorods via surface interactions". Nanoscale, 2015, Vol. 7, Páginas 14889 - 14896, ISSN 2040-3364 (print). Resumen; apartado 2.3.	6
X	CANO, M. et al. "Partial PEGylation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with amine-silane as a source of ultrastable tunable nanosystems for biomedical applications". Nanoscale, 2017, Vol. 9, Páginas 812-822 [en línea][recuperado el 30/11/2016]. , <DOI: 10.1039/C6NR07462F>. Resumen; apartado 2; página 815, columna 2, párrafo 2; apartado 3.4.	1-5, 8-14, 19, 20
X	ZOLATA H et al. "Synthesis, characterization and theranostic evaluation of Indium-111 labeled multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles". Nuclear Medicine and Biology 2015, Vol. 42, Páginas 164-170, ISSN 0969-8051(print) ISSN 1872-9614(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.nucmedbio.2014.09.007>. Resumen; apartado 4.1.	1-5, 7-18, 20
X	MI-KYONG YOO et al. "Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging". Acta Biomaterialia, 2012, Vol. 8, Páginas 3005 - 3013, ISSN 1742-7061, <DOI: doi:10.1016/j.actbio.2012.04.029>. Resumen; apartados 2.2., 3.1. y 3.2.; figura 3.	1-5, 8-14, 19, 20
A	CHEN, F. et al. "In vivo integrity and biological fate of chelator-free zirconium-89 labeled mesoporous silica nanoparticles". ACS Nano, 2015, Vol. 9, Páginas 7950-7959. Resumen.	1-20
A	WANG, J. et al. "A platinum anticancer theranostic agent with magnetic targeting potential derived from maghemite nanoparticles". Chemical Science, 2013, Vol. 4, Páginas 2605-2612, <DOI: 10.1039/C3SC50554E>. Resumen.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.01.2018

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/04 (2006.01)

C09K11/02 (2006.01)

H01F1/11 (2006.01)

B82B1/00 (2006.01)

B82B3/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C09K, H01F, B82B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, BIOSIS, NPL, XPESP, CAS