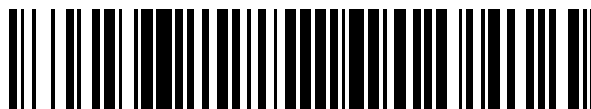


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 481**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/51** (2006.01)

**A61K 33/24** (2009.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012** **PCT/EP2012/075731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13087920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012** **E 12806026 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2790682**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden materiales metálicos y de óxido de hafnio, preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**16.12.2011 US 201161576437 P**

**16.12.2011 EP 11193968**

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

**22.07.2019**

73 Titular/es:

**NANOBIOTIX (100.0%)**

**60 rue de Wattignies**

**75012 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**POTTIER, AGNÈS;**

**LEVY, LAURENT y**

**MEYRE, MARIE-EDITH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 720 481 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

Nanopartículas que comprenden materiales metálicos y de óxido de hafnio, preparación y usos de los mismos

La presente invención versa sobre nanopartículas novedosas que pueden ser usadas con ventaja en el campo de la salud como agentes diagnósticos y/o terapéuticos. Las nanopartículas de la invención comprenden un material metálico cubierto, al menos parcialmente, con un material de óxido, preferentemente un material de óxido de hafnio, o embebido en el mismo. Cuando se las compara con productos existentes, estas nanopartículas ofrecen una notable proporción de beneficio sobre el riesgo. Específicamente, estas nanopartículas potencian la eficacia de las nanopartículas metálicas conocidas. De hecho, retienen las propiedades intrínsecas del metal y, además, ahora son utilizables con seguridad en un mamífero, en particular en un ser humano. La invención también versa sobre métodos de producción de dichas nanopartículas, sobre composiciones que las contienen y sobre usos de las mismas.

## Antecedentes

La nanotecnología ofrece estrategias revolucionarias de mejora de la asistencia médica. Sin embargo, como para cualquier producto de asistencia médica, en el campo de la nanomedicina, el concepto de la toxicidad prevista/imprevista debería ser considerado desde la perspectiva tanto de lo que podría preverse por las propiedades químicas y farmacológicas de un producto medicinal como de lo que se conoce en término de la observación o la documentación previa.

Los problemas toxicológicos de las nanopartículas son de máxima importancia cuando se diseña un nanomaterial. La toxicidad potencial de nanomateriales diseñados desarrollados para una aplicación diagnóstica o terapéutica ha de ser considerada y abarca fenómenos tales como la liberación de especies tóxicas en medios biológicos, fenómenos redox, transferencia de electrones y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la adsorción de proteínas en la superficie de las nanopartículas puede desencadenar diversos fenómenos adversos tales como el cambio en la conformación proteínica y la subsiguiente pérdida de actividad enzimática, fibrilación o exposición a nuevos epítomos antígenicos. La farmacocinética es un parámetro determinante de eficacia y predicción de la seguridad. Las nanopartículas, que no están degradadas o lo están levemente, después de ser capturadas por células fagocíticas mononucleares, pueden ser atrapadas en el sistema reticuloendotelial (RES), en el que se acumulan y pueden inducir efectos secundarios poco deseables.

Se percibe que el recubrimiento (la funcionalización) de la superficie de las nanopartículas es un planteamiento atractivo para potenciar la seguridad de las nanopartículas al desempeñar diferentes papeles, tales como impedir la biorreactividad de las nanopartículas y la disolución de las nanopartículas. De hecho, el recubrimiento de las nanopartículas con una envoltura protectora parece un medio eficaz de reducción de su toxicidad. Materiales adecuados de envoltura incluyen sustancias orgánicas o inorgánicas biocompatibles tales como compuestos de polietilenglicol (compuestos de PEG), sílice (SiO<sub>2</sub>) y polímeros biocompatibles. Sin embargo, estos recubrimientos son ambientalmente lábiles o degradables y un material inicialmente no tóxico puede volverse peligroso después de desprenderse de su recubrimiento, cuando el núcleo de la nanopartícula queda expuesto al cuerpo.

El cáncer es una causa principal de fallecimiento a escala mundial, que representó 7,6 millones de fallecimientos (aproximadamente un 13% de todos los fallecimientos) en 2008. Se prevé que los fallecimientos por cáncer sigan aumentando, con una estimación de 12 millones de fallecimientos para 2030 (OMS). La cirugía, la radioterapia y los fármacos son de importancia capital como modalidades de tratamiento antitumoral, pudiendo usarse cada uno de ellos solo o en combinación, dependiendo del tipo de cáncer que se esté tratando. La elección de terapia depende de la ubicación y de la clasificación del grado del tumor, de la fase de la enfermedad, así como del estado de salud del paciente.

Los agentes antitumorales que atacan el ciclo celular y el ADN, tales como los citotóxicos o los rayos X, están entre los más efectivos en el uso clínico y han producido un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes con cáncer cuando son usados solos o en combinación con fármacos que tienen diferentes mecanismos de acción. También son sumamente tóxicos y presentan una ventana terapéutica estrecha.

Por lo tanto, sigue habiendo considerable interés en el campo del cáncer por modificar la proporción terapéutica, con el objetivo de mejorar la eficacia y la seguridad.

La nanotecnología ofrece una solución ventajosa para administrar terapias de manera directa y selectiva a células cancerosas. En años recientes, las nanopartículas metálicas han mostrado gran promesa para el diagnóstico y la terapia. Entre las nanopartículas metálicas, han sido propuestas en particular las nanopartículas de oro, especialmente como radiosensibilizadoras en el contexto de la radioterapia (WO 2004/112590), como agentes de contraste en el contexto del diagnóstico (WO2003/075961), como agentes fototérmicos en el contexto de la terapia por hipertermia (WO2009/091597), y como vehículos farmacológicos en el contexto de la quimioterapia (WO2002/087509).

El oro ha sido considerado bioinerte (es decir, ausencia de reactividad bioquímica) desde hace mucho, y mantiene esa consideración, y, así, es utilizable *in vivo* en un mamífero (WO2011/127061). Sin embargo, los inventores y otros consideran ahora que esta opinión es dudosa.

Monografías recientes han cuestionado el comportamiento inerte de las nanopartículas de oro en medios biológicos que podrían reducir su uso en aplicación médicas.

Cho WS. *et al.* [Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236 (2009) 16-24] llevaron a cabo un estudio de toxicidad *in vivo* usando nanopartículas de oro de 13 nm de tamaño recubiertas con PEG. Las nanopartículas de oro de 13 nm recubiertas con PEG-5000 fueron inyectadas de manera intravenosa (0, 0,17, 0,85 o 4,26 mg/kg de peso corporal en ratones BALB/C). Se descubrió que las nanopartículas se acumulaban en el hígado y el bazo durante hasta 7 días. Además, las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) demostraron que numerosas vesículas citoplasmáticas y lisosomas de células hepáticas de Kupffer y macrófagos del bazo contenían nanopartículas de oro recubiertas con PEG. La apoptosis de los hepatocitos del hígado 7 días después del tratamiento fue significativamente mayor para los ratones que recibieron 0,85 y 4,26 mg/kg de nanopartículas de oro. Las células apoptóticas eran aproximadamente el 10% en el grupo de alta dosificación a los siete días. Aunque las respuestas inflamatorias transitorias eran insignificantes para la toxicidad de las nanopartículas de oro de 13 nm recubiertas con PEG, la apoptosis de los hepatocitos del hígado es un efecto adverso importante inducido por el tratamiento con nanopartículas de oro de 13 nm recubiertas con PEG.

Sadauskas E. *et al.* [Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver, *Nanomedicine* 5 (2009) 162-9] estudiaron el destino de nanopartículas de oro de 40 nm después de inyecciones intravenosas. Las nanopartículas de oro fueron inyectadas de forma intravenosa (0,5 mL -  $9 \cdot 10^{10}$  partículas por mL) en ratones adultos C57BL. Grupos experimentales fueron sacrificados después de 1 día, 1 mes, 3 meses y 6 meses. El grupo de control fue sacrificado después de 1 día. El descubrimiento por ICP-MS de una caída del 9% en el contenido de oro del día 1 a los 6 meses reveló una prolongada renovación de las células de Kupffer cargadas con oro. La tinción autometalográfica (AMG) demostró que había un número decreciente de células de Kupffer que contenían nanopartículas de oro después de un largo periodo de exposición y una disminución significativa en las áreas con tinción AMG después de 1 mes. Los autores creen que esto refleja canibalismo entre células de Kupffer. Observaron lisosomas grandes de aspecto poco sano que contenían oro en animales que sobrevivieron durante de 3 a 6 meses, lo que puede apoyar la noción de que una célula de Kupffer muere y es fagocitada por las células de Kupffer circundantes.

Chen YS. *et al.* [Assessment of the *in vivo* toxicity of gold nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 4(8) (2009) 858-64] llevaron a cabo un estudio de toxicidad *in vivo* usando nanopartículas de oro de 3, 5, 12, 17, 37, 50 y 100-nm. Las nanopartículas de oro fueron inyectadas intraperitonealmente en ratones BALB/C a una dosis de 8 mg/kg/semana. Las nanopartículas de oro que oscilan en tamaño entre 8 y 37 nm indujeron una grave enfermedad en los ratones (tiempo medio de supervivencia = 21 días). La exploración patológica de los principales órganos de los ratones en los grupos enfermos indicó un incremento de las células de Kupffer en el hígado (la activación de las células de Kupffer sugería un potencial tóxico para las nanopartículas de oro en esta zona), una pérdida de integridad estructural en los pulmones (estructura observada similar a la del enfisema) y una difusión de pulpa blanca en el bazo. La anomalía patológica fue asociada con la presencia de nanopartículas de oro en los sitios enfermos.

Los inventores descubrieron con sorpresa y describen ahora en la presente memoria que el óxido de hafnio es capaz, cuando es usado debidamente en combinación con material metálico, de hacer no tóxico dicho material metálico, en particular el oro, sin que sea perjudicial para las propiedades terapéuticas y diagnósticas del metal, haciendo con ello que el producto de la invención sea utilizable con ventaja *in vivo* en un mamífero.

Los inventores creen, además, que la combinación reivindicada de materiales metálicos y de óxido de hafnio puede ser responsable de un depósito eficiente de energía dentro de la estructura del tumor, siendo responsable dicho depósito de la gran potenciación de la destrucción tumoral *in vivo* cuando es activada por radiaciones en comparación con tratamientos estándar.

### Compendio de la invención

Los inventores proporcionan en la presente memoria una nanopartícula como se define adicionalmente en las reivindicaciones, para ser usada en un mamífero, que comprende un material metálico cubierto, al menos parcialmente, con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo. En una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula de núcleo-envoltura de metal-óxido comprende un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo. También proporcionan una composición que comprende tal nanopartícula junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede ser una composición de diagnóstico o una composición farmacéutica. Los inventores describen, además, sus productos para ser usados en un mamífero, preferentemente en un ser humano, como un agente de diagnóstico y/o como un agente terapéutico, en particular en oncología, más en particular cuando la nanopartícula es expuesta a radiación.

### Figuras

La Figura 1 proporciona una ilustración de la estructura de la nanopartícula de la invención.

La Figura 1A proporciona una ilustración de una cristalita metálica o de un agregado de cristalitas metálicas.

La Figura 1B proporciona una ilustración de nanopartículas de núcleo-envoltura de metal-óxido que comprenden un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo.

La Figura 1C proporciona una ilustración de nanopartículas que comprenden un material metálico cubierto, al menos parcialmente, con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo.

- 5 La Figura 2 proporciona una ilustración de la proporción de beneficio sobre el riesgo de esta estructura de la nanopartícula de la invención en comparación con una nanopartícula metálica carente de material de óxido de hafnio, en particular en oncología, más en particular cuando la nanopartícula es expuesta a radiaciones.

La Figura 3 proporciona una imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de oro de 60 nm de tamaño del Ejemplo 1.

- 10 La Figura 4: La estructura cristalina de las nanopartículas de oro preparadas (Ejemplo 1) es determinada por difracción electrónica.

La Figura 4A muestra el patrón de difracción electrónica de nanopartículas de referencia (las nanopartículas de oro con estructura cúbica centrada en las caras son usadas como referencia para establecer la constante de cámara ( $L\lambda$ ) del microscopio electrónico de transmisión) y de nanopartículas de oro (GNP) del Ejemplo 1.

- 15 La Figura 4B documenta la indexación de las nanopartículas de oro (del Ejemplo 1), el patrón de difracción electrónica que muestra una estructura cúbica centrada en las caras (CFC) de las nanopartículas de oro. La indexación del patrón de difracción electrónica consiste en las siguientes etapas:

- 1) establecer la constante de cámara a partir del patrón de difracción electrónica de la referencia,
- 2) medir el diámetro ( $D_1$ ,  $D_2$ , ...,  $D_n$ ) del anillo del patrón de difracción electrónica de las nanopartículas de oro del Ejemplo 1,
- 20 3) calcular el  $d_{hkl}$ , usando la expresión  $d_{hkl} = L\lambda/(D_n/2)$ ,
- 4) usar la base de datos existente de estructuras para indexar cada anillo.

La Figura 5 proporciona imágenes del patrón de difracción electrónica de un conjunto de tipo núcleo@envoltura Au@HfO<sub>2</sub> de una nanopartícula de oro y material de óxido de hafnio del Ejemplo 4.

- 25 La Figura 5A muestra el patrón de difracción electrónica de las nanopartículas de oro@HfO<sub>2</sub> del Ejemplo 4.

La Figura 5B documenta la indexación de las nanopartículas de oro@HfO<sub>2</sub> (del Ejemplo 4). La indexación del patrón de difracción electrónica consiste en las siguientes etapas:

- 1) establecer la constante de cámara a partir del patrón de difracción electrónica de la referencia (Figura 4A),
- 2) medir el diámetro ( $D_1$ ,  $D_2$ , ...,  $D_n$ ) del anillo del patrón de difracción electrónica de las nanopartículas de Au@HfO<sub>2</sub> del Ejemplo 4,
- 30 3) calcular el  $d_{hkl}$ , usando la expresión  $d_{hkl} = L\lambda/(D_n/2)$ ,
- 4) usar la base de datos existente de estructuras para indexar cada anillo.

- 35 La Figura 6 proporciona una imagen de microscopía electrónica de transmisión de un conjunto de tipo núcleo@envoltura Au@HfO<sub>2</sub> de las nanopartículas de oro y material de óxido de hafnio del Ejemplo 4. En este negativo, puede observarse que una envoltura cubre la superficie de la nanopartícula de oro. Esta envoltura comprende, según demuestra la difracción electrónica, material de óxido de hafnio.

### Descripción detallada

La nanopartícula de la invención definida en las reivindicaciones para ser usada en un mamífero comprende un material metálico cubierto, al menos en parte, con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo.

- 40 En el contexto del desarrollo de semiconductores de metal-óxido (MOS) para la miniaturización de transistores para dispositivos electrónicos, Sargentis Ch. *et al.* [Simple method for the fabrication of a high dielectric constant metal-oxide-semiconductor capacitor embedded with Pt nanoparticles, Appl. Phys. Lett. 88(073106) (2006) 1-3] desarrollaron un método simple de evaporación por haz electrónico para fabricar un dispositivo MOS embebido con nanopartículas de Pt en su superficie de contacto SiO<sub>2</sub>/HfO<sub>2</sub>. Las nanopartículas de Pt fabricadas tienen un diámetro medio de 4,9 nm y la densidad lamelar es de  $3,2 \times 10^{12}$  nanopartículas/cm<sup>2</sup>. Este objeto, previsto para ser usado en el desarrollo de dispositivos electrónicos, está compuesto de nanopartículas metálicas parcialmente embebidas en una capa de óxido de hafnio. Al contrario que el objeto de la presente invención, este objeto es una lámina y no una nanopartícula.
- 45

En una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula de núcleo-envoltura de metal-óxido que comprende un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo.

5 En el espíritu de la invención, el término “nanopartícula” se refiere, como se explica adicionalmente más abajo, a productos, en particular productos sintéticos, con un tamaño en el intervalo nanométrico, normalmente entre 1 nm y 500 nm.

El material metálico es normalmente una cristalita metálica o un agregado de cristalitas metálicas. La nanopartícula de la invención comprende, con ventaja, una o varias cristalitas metálicas.

10 En una realización preferente, la nanopartícula de la invención comprende varias cristalitas de óxido de hafnio y/o agregados de varias cristalitas de óxido de hafnio.

En una realización particular, cada uno del material metálico y del material de óxido de hafnio consiste en una cristalita o en un agregado de cristalitas.

15 En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula de óxido metálico de núcleo-envoltura que comprende un material metálico que es normalmente una cristalita metálica o un agregado de cristalitas metálicas completamente cubierto con un material de óxido de hafnio.

En la presente memoria, el término “cristalita” se refiere a un producto cristalino. El tamaño de la cristalita y su estructura y su composición pueden ser analizados con un difractograma de rayos X.

La expresión “agregado de cristalitas” se refiere a un conjunto de cristalitas unidas fuertemente entre sí, normalmente de forma covalente.

20 El material metálico puede ser seleccionado con ventaja entre oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), paladio (Pd), estaño (Sn), tantalio (Ta), iterbio (Yb), circonio (Zr), hafnio (Hf), terbio (Tb), tulio (Tm), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), holmio (Ho), hierro (Fe), lantano (La), neodimio (Nd), praseodimio (Pr), lutecio (Lu) y mezclas de los mismos. El metal es seleccionado, preferentemente, entre oro, plata, tantalio, platino, paladio, estaño, circonio, hafnio, lutecio y hierro, aún más preferentemente entre circonio, hafnio, tantalio y oro. Lo más preferible es que el material  
25 metálico sea oro o tantalio, aún más preferentemente oro.

En una realización particular, al menos el 80% —por ejemplo, 85%, 86%, 87%, 88% u 89%—, del material metálico está protegido contra cualquier interacción con un material biológico por el material de óxido de hafnio. Más preferentemente, el menos el 90% —normalmente entre el 90% y el 98%; por ejemplo 95%— del material metálico está protegido contra cualquier interacción con un material biológico por el material de óxido de hafnio.

30 En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula de metal-óxido de núcleo-envoltura también identificada como núcleo@envoltura metal@óxido, nanopartícula que comprende un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo.

La nanopartícula de la invención comprende un material metálico que bien está cubierto al menos parcialmente con material de óxido de hafnio o bien está completamente cubierto con un material de óxido de hafnio, dependiendo del  
35 uso previsto.

Por ejemplo, cuando las nanopartículas de la invención son usadas como agentes de contraste en el contexto del diagnóstico o como radiosensibilizadores en el contexto de la terapia, el material metálico está completamente cubierto, con ventaja, con un material de óxido de hafnio (nanopartícula de núcleo@envoltura metal@óxido), pero  
40 cuando las nanopartículas de la invención son usadas como agentes fototérmicos en el contexto de la terapia por hipertermia o como vehículos farmacológicos en el contexto de la quimioterapia, el material metálico está cubierto, preferentemente, al menos en parte, con un material de óxido de hafnio.

En una realización particular, para retener las propiedades intrínsecas de los materiales metálicos, puede ser deseable que el material de óxido de hafnio que cubre o embebe el material metálico permita la difusión de moléculas pequeñas. En particular, es importante que el material de óxido de hafnio que cubre o embebe el material metálico permita el  
45 paso de agua o de fármacos, sino que protege al material metálico de cualquier interacción con materiales biológicos.

En el contexto del diagnóstico o la radioterapia, una cobertura completa de la composición metálica es apreciable. En el contexto del diagnóstico, esta cobertura completa es incluso preferida para optimizar un uso seguro del producto.

La cobertura apropiada del material metálico por parte del material de óxido de hafnio puede ser regulada para que la superficie de las nanopartículas, cuando es determinada mediante análisis de superficie BET (Brunauer, Emmett y  
50 Teller), sea igual o superior a la superficie de las nanopartículas, cuando normalmente está determinada por el análisis de superficie CTAB.

El análisis de superficie BET se basa en la absorción de un gas, habitualmente nitrógeno, en la superficie de la nanopartícula (las nanopartículas se encuentran en forma de polvo). La superficie BET proporciona la superficie “total” de la nanopartícula, incluyendo su porosidad.

5 El análisis de superficie CTAB se basa en la absorción de la molécula de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en la superficie de la nanopartícula (las nanopartículas están en solución). La molécula de CTAB es relativamente grande, por lo que no es adsorbida en los microporos. Así, la superficie CTAB refleja solo la superficie de la nanopartícula que está disponible para la interacción con grandes moléculas, tales como interacciones con materiales biológicos. Si no, podrían usarse otras moléculas (como proteínas) en el contexto de la invención para estimar la superficie de esta nanopartícula.

10 Cuando la nanopartícula comprende un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio, la superficie BET se correlaciona con la superficie calculada teniendo en cuenta la forma de la nanopartícula y la proporción relativa del metal y los materiales de óxido de hafnio que constituyen la nanopartícula, determinándose ambos normalmente por cuantificación de los elementos de metal y hafnio, usando un análisis de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP MS).

15 La forma de la nanopartícula puede ser, por ejemplo, redonda, plana, alargada, poligonal, esférica, ovoide u ovalada, y similares. La forma puede ser determinada o controlada por el método de producción y estar adaptada por la persona experta en la técnica.

20 Dado que la forma de las partículas puede influir en su “biocompatibilidad”, se prefieren partículas que tengan una forma bastante homogénea. Así, por razones farmacocinéticas, se prefieren las nanopartículas que tienen forma esencialmente esférica, redonda u ovoide. Tal forma también favorece la interacción de las nanopartículas con células o la captación por parte de las mismas. Se prefiere en particular la forma esférica o redonda.

25 En la presente memoria, las expresiones “tamaño de la nanopartícula” y “máximo tamaño de la nanopartícula” se refieren a la “máxima dimensión de la nanopartícula”. Puede usarse microscopía electrónica de transmisión (TEM) para medir el tamaño de la nanopartícula. También puede usarse dispersión dinámica de la luz (DLS) para medir el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en solución. Estos dos métodos pueden ser usados, además, uno tras otro para comparar las mediciones de tamaño y confirmar dicho tamaño.

Normalmente, la máxima dimensión es el diámetro de una nanopartícula de forma redonda o esférica, o la máxima longitud de una nanopartícula de forma ovoide u ovalada.

30 Según se define en la presente memoria, la máxima dimensión de una nanopartícula se encuentra normalmente entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 250 nm, preferentemente entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 100 o aproximadamente 200 nm, aún más preferentemente entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 150 nm.

35 El tamaño de la cristallita metálica (máxima dimensión de una cristallita metálica) se encuentra normalmente entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 100 nm, por ejemplo entre aproximadamente 2 nm y 60 nm o entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 50 nm. Ejemplos típicos de tamaños de la cristallita metálica son 5, 10, 15, 30 y 50 nm.

40 El tamaño de un agregado de cristallitas metálicas (máxima dimensión de un agregado de cristallitas metálicas) se encuentra normalmente entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 100 nm, por ejemplo entre 20 nm y 50 nm. El tamaño de la cristallita de óxido de hafnio (máxima dimensión de una cristallita de óxido de hafnio) se encuentra normalmente entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm, preferentemente entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 50 nm, por ejemplo entre 5 nm y 30 nm. Ejemplos típicos de tamaños de cristallita de óxido de hafnio son 2, 5, 10, 15, 20 y 25 nm.

45 El tamaño de un agregado de cristallitas de óxido de hafnio (máxima dimensión de un agregado de cristallitas de óxido de hafnio) se encuentra normalmente entre aproximadamente 20 nm y aproximadamente 100 nm; por ejemplo, entre 30 nm y 70 nm.

El tamaño de la cristallita de óxido de hafnio o el tamaño de un agregado de cristallitas de óxido de hafnio corresponde, en el contexto de la nanopartícula de núcleo@envoltura metal@óxido, al grosor de la envoltura de óxido de hafnio.

50 En la nanopartícula de la invención, el material metálico puede estar recubierto, de forma ventajosa, con un agente, definido en la presente memoria como un “agente conector”, que favorece la adhesión entre el metal y el material de óxido de hafnio. La adhesión, en el contexto de la presente invención, significa que se establecen interacciones débiles (hidrógeno o electrostáticas) o fuertes (covalentes) entre el agente conector y el metal, y entre el agente conector y el material de óxido de hafnio. Se prefieren las interacciones fuertes. El agente conector es un compuesto capaz de interactuar, normalmente por enlace covalente o enlace electrostático, con la superficie del material metálico y con el material de óxido de hafnio.

El compuesto conector puede comprender dos grupos terminales:  $R_1$  y  $R_2$ . La función de  $R_1$  es interactuar con el material metálico y la función de  $R_2$  es interactuar con el material de óxido de hafnio.

$R_1$  puede seleccionarse, por ejemplo, entre un grupo carboxilato ( $R_2$ -X-COO<sup>-</sup>), fosfónico ( $R_2$ -X-PO(OH)<sub>2</sub>), fosfórico ( $R_2$ -X-O-PO(OH)<sub>2</sub>), fosfato ( $R_2$ -X-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) y tiol ( $R_2$ -X-SH).

- 5  $R_2$  puede seleccionarse, por ejemplo, entre un grupo carboxilato ( $R_1$ -X-COO<sup>-</sup>), silano ( $R_1$ -X-Si(OR)<sub>3</sub>) o (Si(OR)<sub>4</sub>), fosfónico ( $R_1$ -X-PO(OH)<sub>2</sub>), fosfórico ( $R_1$ -X-O-PO(OH)<sub>2</sub>), fosfato ( $R_1$ -X-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) y tiol ( $R_1$ -X-SH).

“X” es una cadena que puede ser una cadena lineal o cíclica que contiene al menos un átomo. La cadena “X” puede seleccionarse, por ejemplo, entre una cadena que contiene átomos de carbono (tales como una cadena de alcano), una cadena que contiene átomos de carbono y oxígeno (tal como una cadena de óxido de polietileno o una cadena de hidrato de carbono), una cadena que contiene átomos de silicio (tal como una cadena de silicona), y una cadena que contiene átomos de fósforo (tal como una cadena de polifosfato).

- 10

En una realización preferente, el material metálico y/o el material de óxido de hafnio de la nanopartícula reivindicada están unidos a moléculas de fármaco.

- 15 Las moléculas de fármaco pueden interactuar ya sea con el material metálico y/o con el material de óxido de hafnio a través de, por ejemplo, interacciones de hidrógeno, interacciones electrostáticas o enlace covalente. La molécula de fármaco puede comprender, además, en enlace escindible que permite la liberación de la molécula de fármaco cuando la nanopartícula es expuesta a un estímulo específico.

Tal enlace escindible puede ser seleccionado, por ejemplo, de un enlace disulfuro o un enlace sensible al pH, tal como un enlace hidrazona.

- 20 El estímulo específico capaz de escindir el enlace puede ser un estímulo ambiental o un estímulo físico, normalmente un estímulo físico externo. Un estímulo ambiental capaz de escindir el enlace puede ser, por ejemplo, el pH, capaz de escindir el enlace sensible al pH, o un entorno reductor, capaz de reducir el enlace disulfuro. El estímulo físico capaz de escindir el enlace puede ser por ejemplo, una radiación, en particular una radiación ionizante.

- 25 Las moléculas de fármaco en el contexto de la presente invención incluyen cualquier compuesto con efectos terapéuticos o profilácticos. Puede ser un compuesto que afecte, por ejemplo, al desarrollo tisular, al desarrollo celular o a la diferenciación celular o participe en ellos. También puede ser un compuesto que sea capaz de inducir una acción biológica, tal como una respuesta inmunitaria.

- 30 Una lista no limitante de ejemplos incluye agentes antimicrobianos (incluyendo agentes antibacterianos, en particular antibióticos, antivirales y agentes antifúngicos); agentes antitumorales, en particular agentes quimioterapéuticos anticancerosos, tales como uno o varios citostáticos, citotóxicos y cualquier otro producto biológico o inorgánico concebido para tratar el cáncer, tal como un ácido nucleico terapéutico, en particular un microARN (miARN), un ARN horquillado corto (ARNhc) y/o un ARN interferente pequeño (ARNip). El fármaco también puede ser un profármaco en el contexto de la presente invención. También puede usarse cualquier combinación de moléculas de fármacos de interés.

- 35 En otra realización, en la presente memoria se describe una nanopartícula en la que el material de óxido de hafnio es recubierto con un material biocompatible seleccionado entre un agente que presenta una propiedad de indetectabilidad, un agente que permite la interacción con una diana biológica, y una combinación de los mismos.

- 40 Se sabe que el efecto de la permeación y la retención mejoradas (“EPR”) es responsable de la acumulación pasiva de las nanopartículas en la masa tumoral, después de un tiempo dado tras su inyección por vía intravenosa (una posible ruta de administración). Se ha observado, de hecho, que los vasos tumorales son muy distintos de los capilares normales y que su “pérdida” vascular fomenta una extravasación selectiva de nanopartículas no habitual en tejidos normales. La falta de drenaje linfático tumoral efectivo impide el aclaramiento de las nanopartículas penetrantes y promueve su acumulación. Las presentes nanopartículas son, así, capaces de atacar con éxito tumores primarios, así como metastásicos, después de la administración intravenosa.

- 45 En una realización preferente, el material de óxido de hafnio de las nanopartículas reivindicadas puede ser recubierto con un material biocompatible seleccionado de un agente que presenta una propiedad de indetectabilidad. De hecho, cuando las nanopartículas de la presente invención son administradas a un sujeto por la vía intravenosa (IV), un recubrimiento biocompatible con un material seleccionado de un agente que presenta una propiedad de indetectabilidad es particularmente ventajoso para optimizar la biodistribución de las nanopartículas. Dicho recubrimiento es responsable de lo que se denomina “propiedad de indetectabilidad” de la nanopartícula.

- 50

El agente que presenta propiedades de indetectabilidad puede ser un agente que presente un grupo estérico. Tal grupo puede ser seleccionado, por ejemplo, entre polietilenglicol (PEG); óxido de polietileno; alcohol polivinílico; poliácido; poliácridamida (poli(N-isopropilacrilamida)); policarbamida; un biopolímero; un polisacárido tal como dextrano, xilano y celulosa; colágeno; un compuesto zwitteriónico, tal como polisulfobetaina; etc.

- En otra realización preferente, el material de óxido de hafnio de las nanopartículas reivindicadas puede ser recubierto con un material biocompatible seleccionado de un agente que permita la interacción con una diana biológica. Tal agente puede normalmente acercar una carga positiva o negativa a la superficie de las nanopartículas. Esta carga puede determinarse por mediciones del potencial zeta, realizado normalmente en suspensiones de nanopartículas cuya concentración varía entre 0,2 y 10 g/L, estando suspendidas las nanopartículas en un medio acuoso con un pH comprendido entre 6 y 8.
- Un agente que forma una carga positiva en la superficie de las nanopartículas puede ser, por ejemplo, aminopropiltriethoxisilano o polilisina. Un agente que forma una carga negativa en la superficie de las nanopartículas puede ser, por ejemplo, un fosfato (por ejemplo un polifosfato, un metafosfato, un pirofosfato, etc.), un carboxilato (por ejemplo, citrato o ácido dicarboxílico, en particular ácido succínico) o un sulfato.
- Puede ser ventajoso un recubrimiento completo biocompatible de la nanopartícula o del agregado, en particular en el contexto intravenoso (IV), para evitar la interacción de la superficie de las partículas con cualquier elemento de reconocimiento (macrófago, opsoninas, etc.). El "recubrimiento completo" implica la presencia de una densidad muy alta de moléculas biocompatibles capaces de crear, al menos, una monocapa completa en la superficie de la partícula.
- El recubrimiento biocompatible permite en particular la estabilidad de las nanopartículas en un fluido, tal como un fluido fisiológico (sangre, plasma, suero, etc.), cualquier medio isotónico o medio fisiológico, por ejemplo, medios que comprendan glucosa (5%) y/o NaCl (0,9%), que se requiera para una administración farmacéutica.
- La estabilidad puede ser confirmada mediante la cuantificación del extracto seco medida en una suspensión de nanopartículas antes y después de la filtración, normalmente en un filtro de 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Ventajosamente, el recubrimiento conserva la integridad de las partículas *in vivo*, garantiza o mejora la biocompatibilidad de las mismas y facilita una funcionalidad opcional de las mismas (por ejemplo, con moléculas separadores, polímeros biocompatibles, agentes de direccionamiento, proteínas, etc.).
- Una nanopartícula particular según la presente invención puede comprender, además, un agente de direccionamiento que permite su interacción con un elemento de reconocimiento presente en la célula diana. Normalmente, tal agente de direccionamiento actúa una vez que las nanopartículas se acumulan en el sitio diana. El agente de direccionamiento puede ser cualquier estructura biológica o química que presente afinidad hacia moléculas presentes en el cuerpo humano o animal. Por ejemplo, puede ser un péptido, oligopéptido o polipéptido, una proteína, un ácido nucleico (ADN, ARN, ARNip, ARNt, miARN, etc.), una hormona, una vitamina, una enzima, el ligando de una molécula expresada por una célula patológica, en particular el ligando de un antígeno tumoral, un receptor hormonal, un receptor de citoquinas o un receptor del factor de crecimiento. Dichos agentes de direccionamiento pueden ser seleccionados, por ejemplo, en el grupo constituido por LHRH, EGF, un folato, un anticuerpo anti-B-FN, E-selectina/P-selectina, un anticuerpo anti-IL-2R $\alpha$ , GHRH, etc.
- Las nanopartículas de la invención pueden ser administradas por vías diferentes, tales como local (intratumoral (IT) en particular), subcutánea, intravenosa (IV), intradérmica, intraarterial, vías aéreas (inhalación), intraperitoneal, intramuscular y vía oral (por la boca). Las nanopartículas pueden ser administradas en una intracavidad, tal como una cavidad virtual de lecho tumoral después de la tumorectomía.
- Pueden llevarse a cabo inyecciones o administraciones reiteradas de nanopartículas, cuando sea apropiado.
- Otro objeto particular de la invención versa sobre una composición farmacéutica que comprende nanopartículas definidas en lo que antecede, preferiblemente junto con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Otro objeto particular de la invención versa sobre una composición de diagnóstico o formación de imágenes que comprende nanopartículas definidas en lo que antecede, preferiblemente junto con un portador o vehículo fisiológicamente aceptable.
- Las composiciones pueden estar en forma de un sólido, un líquido (partículas en suspensión), un aerosol, un gel, una pasta y similares. Las composiciones preferidas están en forma líquida o de gel. Las composiciones particularmente preferidas están en forma líquida.
- El vehículo que se emplea puede ser cualquier soporte clásico para este tipo de aplicación, tales como, por ejemplo, soluciones salinas, isotónicas, estériles, tamponadas y similares. También pueden comprender estabilizantes, edulcorantes, tensioactivos, polímeros y similares. Pueden ser formulados, por ejemplo, como ampollas, aerosol, frascos, comprimidos, cápsulas, usando técnicas conocidas de formulación farmacéutica.
- En las composiciones descritas en la presente memoria, las concentraciones apropiadas o deseables de nanopartículas están comprendidas entre aproximadamente  $10^{-3}$  mg de nanopartículas/gramo de tumor y aproximadamente 100 mg de nanopartículas/gramo de tumor, en particular entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 mg de nanopartículas/gramo de tumor. Estas concentraciones se aplican con independencia de la vía de administración.

- En las composiciones descritas en la presente memoria, las concentraciones apropiadas o deseables de nanopartículas están comprendidas entre aproximadamente  $10^{-3}$  mg de nanopartículas/mL del volumen de la cavidad virtual que queda tras una tumorectomía y aproximadamente 100 mg de nanopartículas/mL del volumen de la cavidad virtual que queda tras una tumorectomía, en particular entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 50 mg de nanopartículas/mL del volumen de la cavidad virtual que queda tras una tumorectomía. Estas concentraciones se aplican con independencia de la vía de administración.
- Generalmente, las composiciones en forma líquida o de gel comprenden entre 0,05 g/L y 400 g/L de nanopartículas, 0,05 g/L y 150 g/L, preferentemente al menos 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 45 g/L, 50 g/L, 55 g/L, 60 g/L, 80 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L, 300 g/L o 350 g/L.
- Idealmente, el extracto seco se mide tras una etapa de secado de la suspensión que comprende las nanopartículas.
- Las composiciones, las partículas y los agregados de la invención pueden ser usados en muchos campos, en particular en medicina humana o veterinaria.
- Nanopartículas y las composiciones según la invención, descritas en la presente memoria, son, preferentemente, para ser usados en un mamífero, aún más preferentemente en un ser humano, como agente diagnóstico, normalmente cuando la nanopartícula es expuesta a radiación, y/o como agente terapéutico, en particular en oncología, preferentemente cuando la nanopartícula es expuesta a radiaciones, en particular radiaciones ionizantes.
- El término “radiación” se refiere a radiación ionizante y no ionizante. La radiación no ionizante incluye ondas de radio, microondas, infrarrojos y luz visible. Normalmente, la radiación ionizante incluye luz ultravioleta, rayos X y rayos gamma.
- Los términos “tratamiento” y “terapia” se refieren a cualquier acción llevada a cabo para corregir funciones anormales, prevenir enfermedades, mejorar los signos patológicos, tales como, en particular, una reducción en el tamaño o el desarrollo de un tejido anormal, en particular de un tumor, un control de dicho tamaño o dicho desarrollo, una supresión o destrucción de células o tejidos anormales, una ralentización del avance de la enfermedad, una estabilización de una enfermedad con retraso de la progresión del cáncer, una reducción en la formación de metástasis, una regresión de una enfermedad o una remisión completa (en el contexto del cáncer, por ejemplo), etc.
- Sin entrar en consideraciones teóricas particulares, los inventores creen que la combinación de reivindicaciones de materiales metálicos y de óxido de hafnio puede ser responsable, en el contexto de la terapia, para el depósito eficiente de energía dentro de la estructura del tumor, cuando las nanopartículas son activadas por radiaciones.
- Normalmente, tras una inyección intravenosa, el efecto de la permeación y la retención mejoradas (“EPR”) será responsable de la acumulación pasiva de las nanopartículas en el sitio del tumor. Tras la activación de nanopartículas por las radiaciones, el depósito de energía potenciará la perfusión tumoral y, en consecuencia, favorecerá aún más la penetración intratumoral de las nanopartículas. La penetración intratumoral potenciada de las nanopartículas (biodisponibilidad intratumoral de las nanopartículas) potenciará la actividad de terapéutica de las nanopartículas de la invención (Figura 2).
- Por ende, un objeto particular de la invención se basa en el uso de una nanopartícula según la presente invención para preparar una composición farmacéutica prevista para alterar, destruir o eliminar células diana en un animal, cuando dichas células son expuestas a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes, y en los métodos correspondientes.
- Las células diana pueden ser células patológicas cualesquiera, es decir, células implicadas en un mecanismo patológico; por ejemplo, células proliferativas, tales como células tumorales, células estenosantes (fibroblastos/células de músculos lisos), o células del sistema inmunitario (huesos de células patológicas). Una aplicación preferida se basa en el tratamiento (por ejemplo, la destrucción o la alteración funcional) de células o tejidos malignos.
- Cualquier realización particular de la invención versa sobre el uso de composiciones o nanopartículas según se define en lo que antecede para producir una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, cuando las nanopartículas son expuestas a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes.
- La presente divulgación abarca, además, el uso de las nanopartículas y/o las composiciones de la invención para prevenir o tratar un cáncer o para paliar los síntomas de un cáncer en un animal, cuando las células son expuestas a radiaciones, en particular a radiaciones ionizantes.
- El tratamiento clásico del cáncer implica sistemáticamente la concurrencia de tratamientos multimodales (por ejemplo, combinación de radioterapia y quimioterapia).
- Las nanopartículas descritas en la presente memoria sometidas a radiaciones, en particular en el contexto de la radioterapia, pueden ser usadas en asociación con un protocolo diferente de terapia del cáncer. Tal protocolo puede ser seleccionado entre el grupo constituido por cirugía, radiocirugía, quimioterapia, un tratamiento que comprende la

administración de uno o varios citostáticos, citotóxicos, una terapia dirigida, una vacuna, radionúclidos, en particular inmunoradionúclidos, y cualquier otro producto biológico o inorgánico pensado para tratar el cáncer.

5 La invención puede ser usada para tratar cualquier tipo de tumor maligno, tal como tumores o tumores malignos hematológicos, y tumores sólidos, en particular de origen epitelial, neuroectodérmico o mesenquimal. Además, pueden usarse nanopartículas para tratar una lesión premaligna o una enfermedad benigna específica para que la clásicamente se usa y/o se indica una terapia de radiación.

10 La invención es aplicable, en el contexto de la terapia, a tumores primarios, o invasiones secundarias, metástasis locales-regionales o distantes, así como en el contexto de la profilaxis para evitar la implicación del sistema nervioso central en una malignidad secundaria, tal como las invasiones observadas (metástasis) de melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de mama, etc.

Las nanopartículas pueden ser usadas en cualquier momento en todo el periodo del tratamiento anticanceroso. Pueden ser administradas, por ejemplo, como neoadyuvante (antes de la intervención quirúrgica para la exéresis de un cáncer) o como adyuvante (después de la cirugía).

15 Las nanopartículas también pueden ser usadas para tumores avanzados que no puedan ser extirpados quirúrgicamente.

20 Las nanopartículas descritas en la presente memoria están pensadas para ser usadas, en particular, para tratar cánceres en los que la radioterapia es un tratamiento clásico. Tal cáncer puede seleccionarse, en particular, del grupo constituido por cáncer de piel, incluyendo neoplasias malignas asociadas con el SIDA, melanoma; tumores del sistema nervioso central, incluyendo los de cerebro, tronco del encéfalo, cerebelo, pituitaria, canal espinal, ojo y órbita; tumores de cabeza y cuello; cánceres de pulmón; cánceres de mama; tumores gastrointestinales tales como cánceres de hígado y tracto hepatobiliar, cánceres de colon, recto y anal, cáncer de estómago, páncreas, esófago; tumores genitourinarios masculinos, como cánceres de próstata, testículos, pene y uretra; tumores ginecológicos como del cuello uterino, el endometrio, el ovario, las trompas de Falopio, la vagina y el cáncer de vulva; tumores suprarrenales y retroperitoneales; sarcomas de hueso y tejidos blandos independientemente de la localización; linfoma; mieloma; leucemia; y tumores pediátricos, como el tumor de Wilm, el neuroblastoma, los tumores del sistema nervioso central, el sarcoma de Ewing, etc.

Las nanopartículas descritas en la presente memoria pueden ser usadas ahora, además, en el contexto de radioterapia, en la que su uso permite una disminución de la dosis de radioterapia mientras se mantiene su eficacia en la destrucción de células tumorales.

30 Bajo el efecto de radiaciones ionizantes, en particular rayos X, rayos gamma, isótopos radiactivos y/o haces de electrones, las nanopartículas son excitadas y producen electrones y/o fotones de alta energía. Esos electrones y/o fotones de alta energía emitidos tras la ionización serán responsables de lesiones directas y/o indirectas de las células, a través de la generación de radicales libres, y, en último término, de la destrucción de las células, dando lugar a un mejor resultado para el paciente.

35 Así, dependiendo de la energía de las radiaciones ionizantes, las nanopartículas pueden permitir la destrucción de tejidos y/o, simplemente, una visualización para la formación de imágenes y/o con fines diagnósticos.

Las partículas pueden ser excitadas en un amplio intervalo de dosis total de radiación.

40 Se definen cantidades y programas (planificación y administración de irradiaciones en una sola dosis, o en el contexto de un protocolo fraccionado o hiperfraccionado, etc.) para cualquier enfermedad/sitio anatómico/fase de la enfermedad/estado del paciente/edad del paciente (niños, adultos, ancianos), y constituyen el estándar de atención para cualquier situación específica.

La irradiación puede ser aplicada en cualquier momento tras la administración de las nanopartículas, en una o más ocasiones, usando cualquier sistema actualmente disponible de radioterapia o radiografía.

45 Según se ha indicado previamente, las radiaciones o fuentes de excitación apropiadas son, preferentemente, radiaciones ionizantes, y pueden ser seleccionadas ventajosamente entre el grupo constituido por rayos X, rayos gamma, haces de electrones, haces de iones e isótopos radiactivos o emisiones de radioisótopos. Los rayos X son una fuente particularmente preferida de excitación.

50 Las radiaciones ionizantes son normalmente de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 25.000 KeV, en particular de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 6000 KeV (fuente LINAC), o de aproximadamente 2 KeV a aproximadamente 1500 KeV (tal como una fuente de cobalto 60).

En general, y de forma no restrictiva, los siguientes rayos X pueden ser aplicados en diferentes casos para excitar las partículas:

- rayos X superficiales de 2 a 50 keV: para excitar las nanopartículas cercanas a la superficie (penetración de unos milímetros);

- rayos X de 50 a 150 keV: en diagnóstico, pero también en terapia;
- rayos X (ortotensión) de 200 a 500 keV, que pueden penetrar un grosor de tejido de 6 cm;
- rayos X (megatensión) de 1000 keV a 25.000 keV. Por ejemplo, la excitación de nanopartículas para el tratamiento del cáncer de próstata puede llevarse a cabo a través de cinco rayos X enfocados con una energía de 15.000 keV.

Alternativamente, pueden usarse isótopos radiactivos como fuente de radiación ionizante (denominado curioterapia o braquiterapia). Pueden usarse con ventaja, en particular, yodo  $I^{125}$  ( $t^{1/2} = 60,1$  días), paladio  $Pd^{103}$  ( $t^{1/2} = 17$  días), cesio  $Cs^{137}$  e iridio  $Ir^{192}$ .

También pueden usarse partículas cargadas tales como haces de protones, haces de iones tales como de carbono, en particular haces de iones de alta energía, como fuente de radiación ionizante y/o haces de neutrones. También pueden usarse haces de electrones como fuente de radiación ionizante con una energía comprendida entre 4 MeV y 25 MeV.

Podría usarse una fuente específica de irradiación monocromática para generar selectivamente radiación de rayos X a una energía cercana o correspondiente al borde deseado de absorción de rayos X de los átomos que constituyen el material metálico o del elemento hafnio.

Preferentemente, las fuentes de radiaciones ionizantes pueden ser seleccionadas entre fuentes de acelerador lineal (LINAC), cobalto 60 y braquiterapia.

En el campo de los diagnósticos, las nanopartículas de la invención pueden ser usadas como agentes de contraste, para detectar y/o visualizar cualquier tipo de tejido. Así, un objeto de la invención versa sobre el uso de nanopartículas, tales como las definidas en lo que antecede, para la detección y/o la visualización de células, tejidos u órganos, siendo las nanopartículas bioinertes como tales y activables (es decir, utilizables como agentes de diagnóstico) cuando son expuestas a radiaciones generadas en particular por dispositivos radiográficos.

La presente divulgación proporciona, además, equipos de reactivos que comprenden una cualquiera de las nanopartículas o composiciones descritas en la presente memoria, así como combinaciones de las mismas. Normalmente, el equipo de reactivos comprende al menos nanopartículas según la presente invención, normalmente una suspensión de las mismas. Generalmente, el equipo de reactivos comprende, además, uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos en la presente memoria de las composiciones de la invención. Puede proporcionarse un aviso de etiquetado, asociado con tal recipiente o tales recipientes, que proporciona instrucciones para usar los productos para el uso de las nanopartículas, o composiciones según los presentes métodos.

Otros aspectos y otras ventajas de la invención resultarán evidentes en los siguientes ejemplos, que son dados con fines de ilustración y no a modo de limitación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Síntesis de cristalitas de oro

Se obtienen cristalitas de oro por reducción de cloruro de oro ( $HAuCl_4$ ) con citrato sódico en solución acuosa. El protocolo se adaptó de G. Frens Nature Physical Science 241 (1973) 21.

En un experimento típico, la solución de  $HAuCl_4$  es calentada hasta hervir. Subsiguientemente, se añade una solución de citrato sódico. La solución resultante se mantuvo bajo ebullición durante un periodo adicional de 5 minutos.

El tamaño de la cristalita puede ser ajustado modificando cuidadosamente la proporción entre citrato y precursor de oro (véase la Tabla 1).

A continuación, las suspensiones así preparadas de cristalitas de oro se lavaron con agua y se concentraron usando un dispositivo de ultrafiltración (célula agitada Amicon modelo 8400 de Millipore) con una membrana de celulosa de 30 kDa, al menos con una concentración de oro igual o superior a 1 g/L. El contenido de oro se determina mediante ICP-MS.

Las suspensiones resultantes son filtradas finalmente a través de un filtro de membrana de corte de 0,22  $\mu m$  (membrana PES de Millipore) bajo una campana laminar y almacenadas a 4°C.

El tamaño de las cristalitas de oro es determinado usando microscopía electrónica de transmisión (TEM) contando más de 200 partículas. Se establecen histogramas y se documentan la media y la desviación típica.

**Tabla 1: Cristalitas de oro típicas obtenidas de la reducción de cloruro de oro con citrato sódico. El tamaño puede ser ajustado modificando la proporción entre citrato y precursor de oro**

| Muestras             | Tamaño de la cristalita | Síntesis     |                    |
|----------------------|-------------------------|--------------|--------------------|
|                      |                         | Citrato      | HAuCl <sub>4</sub> |
| Cristalita de oro-15 | 15±2 nm                 | 20 mL 30 mM  | 500 mL 0,25 mM     |
| Cristalita de oro-30 | 32±10 nm                | 7,5 mL 40 mM | 500 mL 0,25 mM     |
| Cristalita de oro-60 | 60±10 nm                | 2 mL 85 mM   | 500 mL 0,25 mM     |

**Ejemplo 2: Suspensión de nanopartículas que comprende un material de oro cubierto, al menos en parte, con material de óxido de hafnio**

5 Se añade una solución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH) a una solución de cloruro de hafnio (HfCl<sub>4</sub>). Se lleva a cabo la adición de la solución de TMAOH hasta que el pH de la suspensión final alcanza un pH comprendido entre 7 y 13. Se obtiene un precipitado blanco.

La suspensión de cristalitas de oro del Ejemplo 1 es añadida lentamente al precipitado blanco con un mezclado vigoroso.

10 El precipitado resultante es transferido, además, a un autoclave y calentado a una temperatura comprendida entre 100°C y 300°C. Tras enfriar, la suspensión se lava con agua. Se lleva a cabo una etapa de peptización para obtener una suspensión estable de nanopartículas que comprende material de oro al menos parcialmente embebido en material de óxido de hafnio.

A continuación, se añade una suspensión de hexametáfosfato sódico a la solución peptizada y se ajusta el pH de la suspensión a un pH comprendido entre 6 y 8.

15 **Ejemplo 3: Nanopartículas de oro recubiertas con un “agente conector” que favorece la adhesión entre el metal y el material de óxido de hafnio**

Se mezcló una suspensión de 10 mL de nanopartículas de oro con diámetro medio de 60nm a una concentración [Au]=0,1 g/L con una solución de mercaptopropiltietoxisilano (MPTS) en etanol (EtOH). El pH de la suspensión así obtenida se ajustó a  $8 \leq \text{pH} \leq 10$  con una solución básica. A continuación, la mezcla fue calentada en hornillo a una temperatura  $T \geq 90^\circ\text{C}$ .

**Ejemplo 4: Nanopartículas que comprenden oro recubierto con un “agente conector” cubierto, al menos en parte, con un material de óxido de hafnio o completamente embebido en el mismo: conjunto de tipo núcleo@envoltura Au@HfO<sub>2</sub>**

25 Se usaron suspensiones de nanopartículas de oro recubiertas con MPTS como un “agente conector” del Ejemplo 3. Normalmente, se añadieron lentamente 500µL de una solución de cloruro de hafnio (HfCl<sub>4</sub>) de 20g/L a 5ml de una suspensión de nanopartículas de oro recubiertas con MPTS como agente conector. El pH disminuyó rápidamente hasta un pH < 2. A continuación, fue ajustado a  $2 \leq \text{pH} \leq 4$ ,  $4 < \text{pH} < 8$  o a  $8 \leq \text{pH} \leq 10$  con una solución básica. Un pH ácido, neutro o básico permite modular la cristalinidad de las cristalitas de óxido de hafnio. A continuación, las soluciones así obtenidas fueron incubadas en un hornillo, primero a una temperatura  $50^\circ\text{C} \leq T \leq 100^\circ\text{C}$ , luego a  $T \geq 100^\circ\text{C}$  en un autoclave. Según se muestra por TEM (Figura 6), se obtiene una estructura de nanopartícula de núcleo@envoltura Au@HfO<sub>2</sub>.

**Ejemplo 5: Patrones de difracción electrónica de nanopartículas que comprenden oro cubiertas, al menos en parte, con material de óxido de hafnio (Au@HfO<sub>2</sub>) o completamente embebidas en el mismo**

35 Para determinar la estructura cristalina de las nanopartículas así preparadas, se efectuó una difracción electrónica en dos muestras: nanopartículas de oro del Ejemplo 1 (Figura 4) y un conjunto de tipo Au@HfO<sub>2</sub> de nanopartículas de oro y material de óxido de hafnio del Ejemplo 4 (Figura 5).

Para las nanopartículas de oro del Ejemplo 1, la estructura cristalina encontró coincidencias con una estructura CFC con un parámetro de red  $a_{\text{experimental}}=3,984\text{\AA}$  (Figura 4).

40 Para un conjunto de tipo núcleo@envoltura Au@HfO<sub>2</sub> de nanopartículas de oro y material de óxido de hafnio del Ejemplo 4 (Figura 5), el patrón de difracción electrónica muestra puntos correspondientes a distancias interreticulares de estructura cristalina CFC de oro:  $d_{111}$ ,  $d_{200}$ ,  $d_{220}$  y  $d_{311}$ . Se observa un patrón adicional de difracción. La indexación muestra tres distancias interreticulares principales: 2,798Å, 1,599Å y 1,316Å, que pueden ser atribuidas a planos de difracción de la estructura cristalina monoclinica de HfO<sub>2</sub> con  $a=5,12\text{\AA}$ ,  $b=5,18\text{\AA}$ ,  $c=5,25\text{\AA}$  y  $\beta=98^\circ$  (referencia: HfO<sub>2</sub> 00-006-0318) y que se corresponde con  $d_{111}$ ,  $d_{311}$  y  $d_{223}$ , respectivamente.

## REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula que comprende un material metálico cubierto, al menos parcialmente, con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo para ser usada en un mamífero, preferentemente en un ser humano, como agente terapéutico, en particular en oncología, cuando la nanopartícula es expuesta a una radiación, seleccionándose el material metálico entre oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), paladio (Pd), estaño (Sn), tantalio (Ta), iterbio (Yb), circonio (Zr), hafnio (Hf), terbio (Tb), tulio (Tm), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), holmio (Ho), hierro (Fe), lantano (La), neodimio (Nd), praseodimio (Pr), lutecio (Lu) y mezclas de los mismos, y estando protegido al menos un 80% del material metálico de cualquier interacción con un material biológico por el material de óxido de hafnio.
2. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según la reivindicación 1 en la que el material metálico es una cristalita metálica o un agregado de cristalitas metálicas.
3. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según la reivindicación 2, comprendiendo la nanopartícula una o varias cristalitas metálicas.
4. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo la nanopartícula varias cristalitas de óxido de hafnio o agregados de cristalitas de óxido de hafnio.
5. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la máxima dimensión de una cristalita metálica se encuentra entre aproximadamente 2 nm y aproximadamente 100 nm y la máxima dimensión de una cristalita de óxido de hafnio se encuentra entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 50 nm.
6. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la máxima dimensión de una nanopartícula se encuentra entre 10 nm y 250 nm.
7. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el material metálico está recubierto con un agente que favorece la adhesión entre el metal y el material de óxido de hafnio.
8. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el material metálico y/o el material de óxido de hafnio está(n) unido(s) con moléculas de fármaco.
9. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según la reivindicación 8 en el que cada molécula de fármaco comprende una porción escindible que permite la liberación de la molécula de fármaco cuando la nanopartícula es expuesta a un estímulo específico.
10. Nanopartícula para ser usada como agente terapéutico en un mamífero según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el material de óxido de hafnio está recubierto con un material biocompatible seleccionado entre un agente que presenta una propiedad de indetectabilidad, un agente que permite la interacción con una diana biológica, y una combinación de los mismos.
11. Composición que comprende una nanopartícula que comprende un material metálico cubierto, al menos parcialmente, con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Nanopartícula que comprende un material metálico completamente cubierto con un material de óxido de hafnio o embebido en el mismo para ser usada en un mamífero, preferentemente en un ser humano, como agente diagnóstico, cuando la nanopartícula es expuesta a una radiación, seleccionándose el material metálico entre oro (Au), plata (Ag), platino (Pt), paladio (Pd), estaño (Sn), tantalio (Ta), iterbio (Yb), circonio (Zr), hafnio (Hf), terbio (Tb), tulio (Tm), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), holmio (Ho), hierro (Fe), lantano (La), neodimio (Nd), praseodimio (Pr), lutecio (Lu) y mezclas de los mismos.

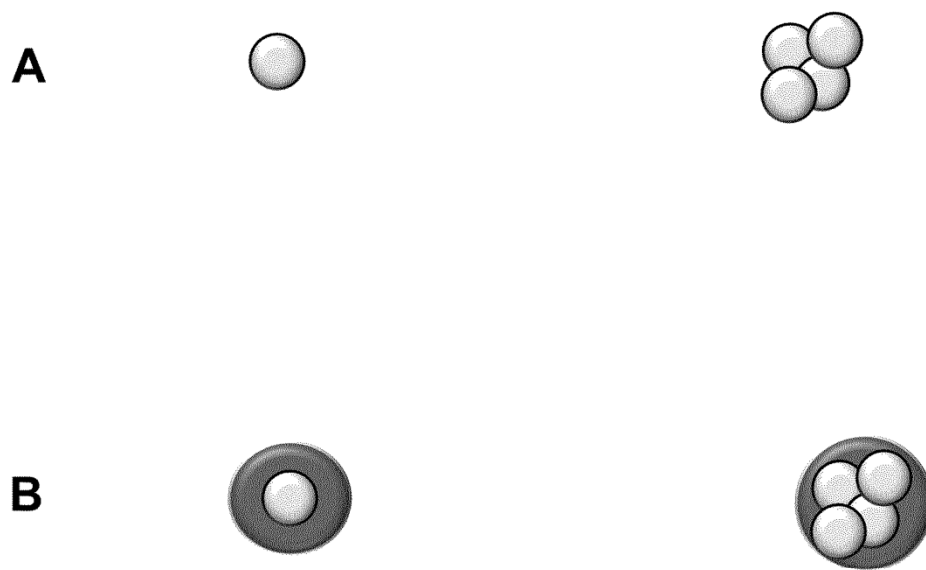


FIGURA 1

C

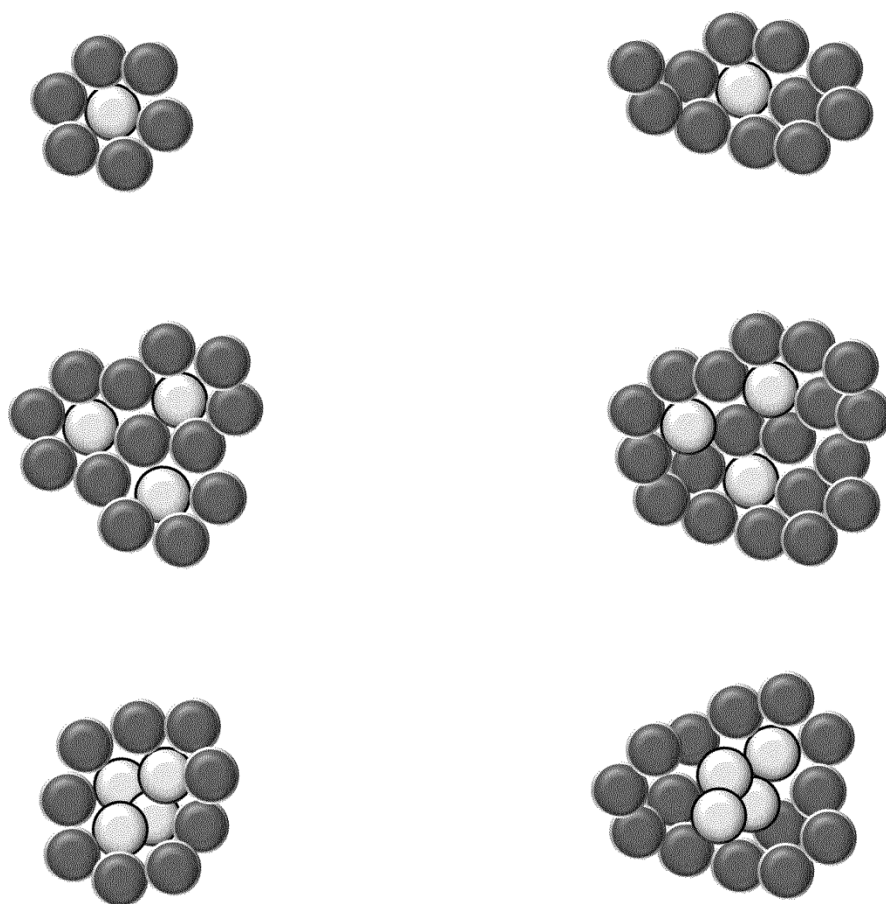


FIGURA 1

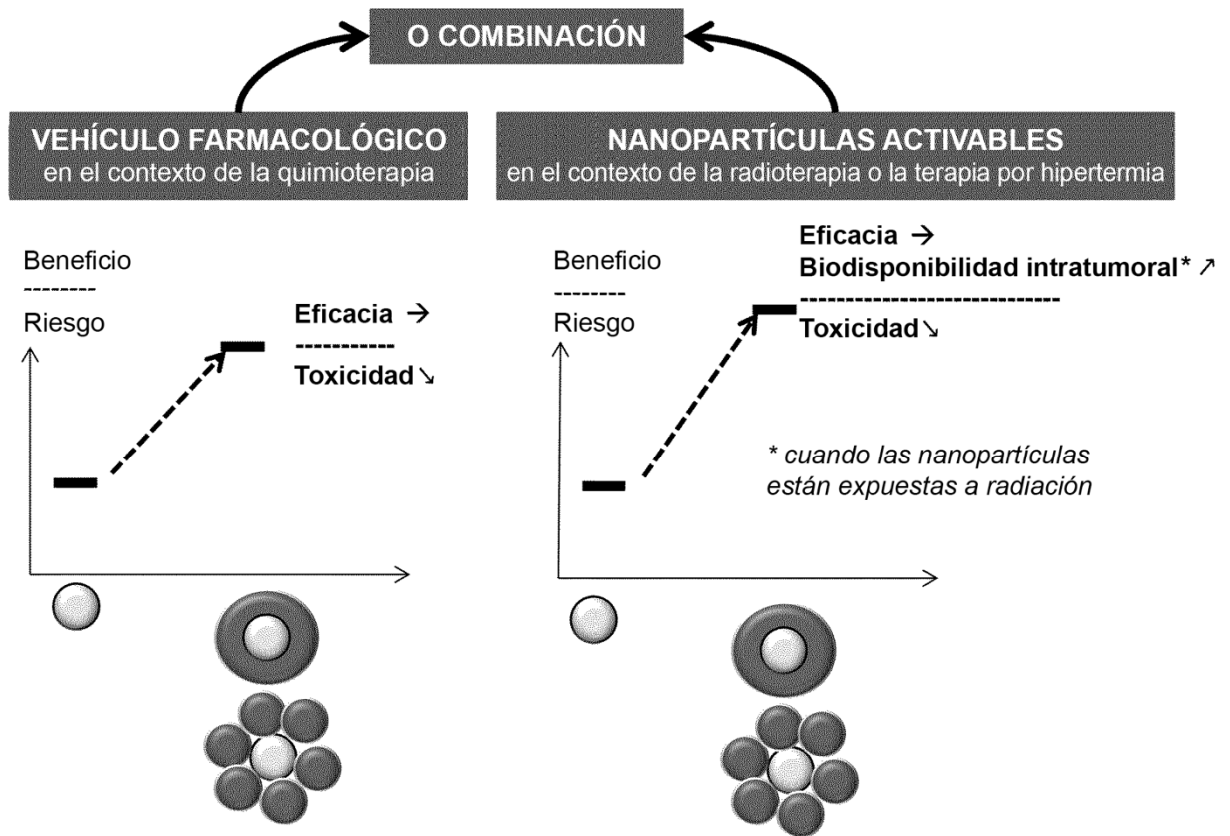


FIGURA 2

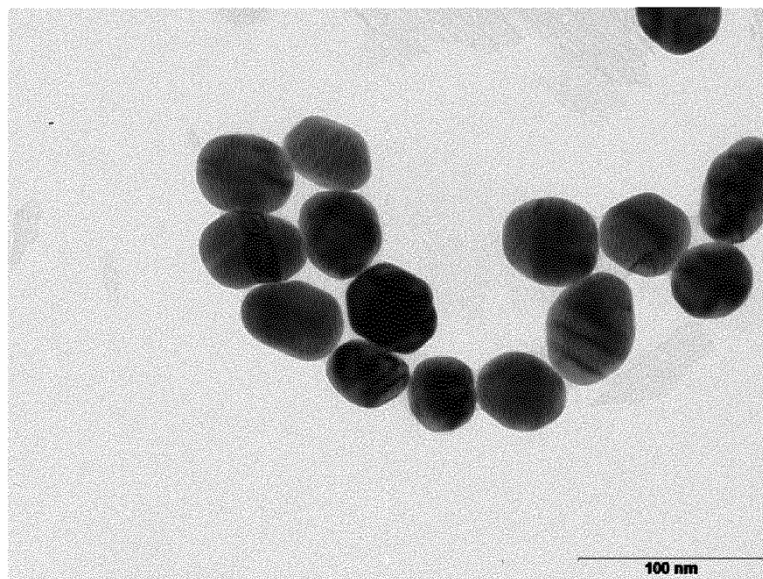
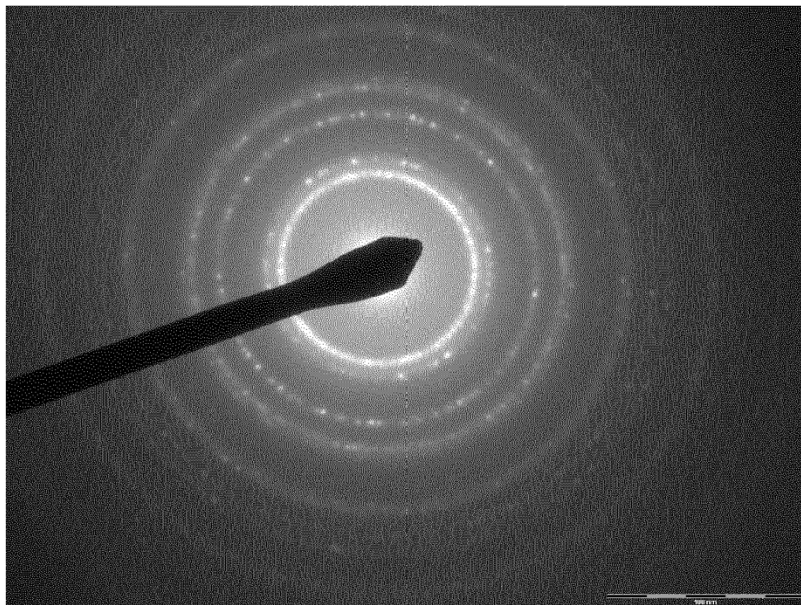


FIGURA 3

Referencia:



Nanopartículas de oro del ejemplo 1:

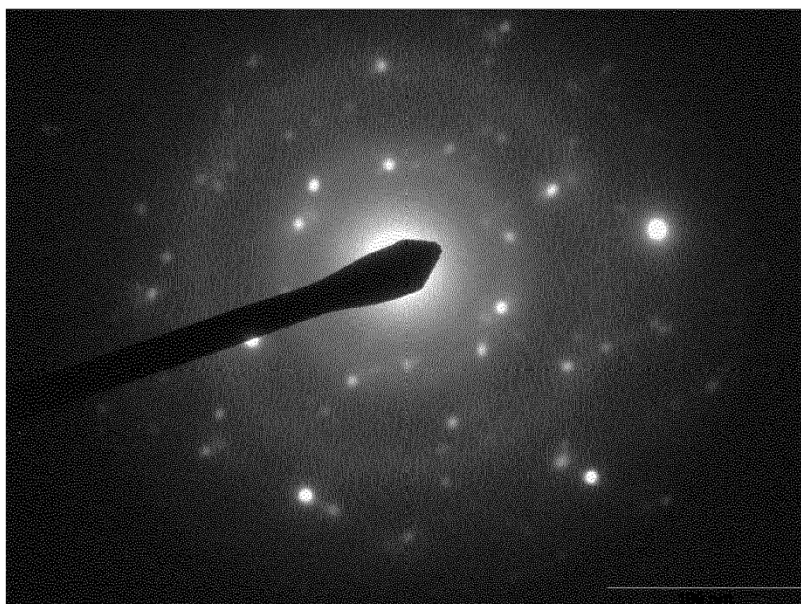


FIGURA 4A

Referencia: nanopartículas de oro con estructura CFC para determinar  $L\lambda$ :

| Diámetro (cm) |     | $d_{hkl}$ (Å) |       | $L\lambda$ |
|---------------|-----|---------------|-------|------------|
| D1            | 2,5 | $d_{111}$     | 2,354 | 2,982      |
| D2            | 2,9 | $d_{200}$     | 2,039 | 2,991      |
| D3            | 4,1 | $d_{220}$     | 1,442 | 2,980      |
| D4            | 4,8 | $d_{311}$     | 1,229 | 2,949      |
|               |     |               |       | 2,975      |

Indexación para nanopartículas de oro del ejemplo 1:

| Diámetro (cm) |     | $L\lambda$ | $d_{hkl}$ (Å) | Atribución                       |
|---------------|-----|------------|---------------|----------------------------------|
| D1            | 2,6 | 2,975      | 2,266         | $d_{111}$                        |
| D2            | 2,9 | 2,975      | 2,035         | $d_{200}$                        |
| D3            | 4,3 | 2,975      | 1,399         | $d_{220}$                        |
| D4            | 4,7 | 2,975      | 1,279         | $d_{311}$                        |
|               |     |            |               | <b>Estructura CFC<br/>de oro</b> |

FIGURA 4B

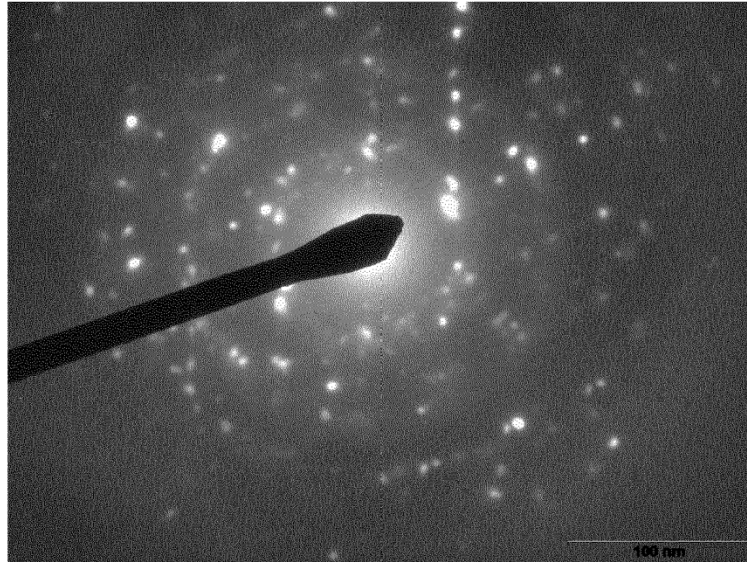


FIGURA 5A

Indexación para nanopartículas de oro@HfO<sub>2</sub> del ejemplo 4:

| Diámetro (nm) |     | d <sub>hkl</sub> experimental (Å) | d <sub>hkl</sub> (Au) | Atribución (Au)              | d <sub>hkl</sub> (HfO <sub>2</sub> ) | Atribución (HfO <sub>2</sub> )                   |
|---------------|-----|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| D1            | 2,1 | 2,798                             |                       |                              | 2,820                                | d <sub>111</sub>                                 |
| D2            | 2,5 | 2,356                             | 2,354                 | d <sub>111</sub>             |                                      |                                                  |
| D3            | 2,9 | 2,035                             | 2,039                 | d <sub>200</sub>             |                                      |                                                  |
| D4            | 3,7 | 1,599                             |                       |                              | 1,600                                | d <sub>-311</sub>                                |
| D5            | 4,3 | 1,399                             | 1,442                 | d <sub>220</sub>             | 1,410                                | d <sub>-321</sub>                                |
| D6            | 4,5 | 1,316                             |                       |                              | 1,318                                | d <sub>-223</sub>                                |
| D7            | 4,9 | 1,226                             | 1,229                 | d <sub>311</sub>             | 1,237                                | d <sub>-411</sub>                                |
|               |     |                                   |                       | <b>Estructura CFC de oro</b> |                                      | <b>Estructura monoclinica de óxido de hafnio</b> |

FIGURA 5B

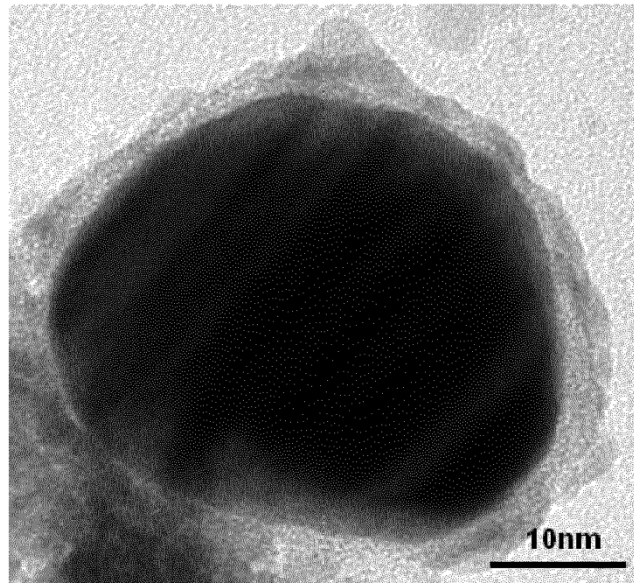


FIGURA 6