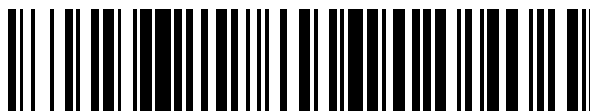


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 551**

51 Int. Cl.:

C01G 1/02 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

B01J 23/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/US2015/027576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15164780**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15722323 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3134347**

54 Título: **Nanopartículas para uso en la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

25.04.2014 US 201461984441 P

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

29.11.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
Office of Technology Transfer, 1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

72 Inventor/es:

PETTY, HOWARD R.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 733 551 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 para uso en la terapia del cáncer

Referencia cruzada con solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad según la Ley 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud de Patente Provisional de los EE.UU. n.º 61/984.441 presentada el 25 de abril de 2014.

Declaración de interés gubernamental

La presente invención también se ha llevado a cabo con el apoyo del gobierno según EY007003 concedida por el Instituto Nacional de la Salud. El gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

Otras fuentes de financiación

10 La presente invención se ha llevado a cabo con el apoyo de Mildred E. Swanson Foundation, Elsa U. Pardee Foundation, The Alliance for Vision Research, Research to Prevent Blindness, así como James Thompson y Mary Ann Brandt.

Campo de la invención

15 La presente descripción se refiere a nanopartículas que comprenden un óxido de metal y un conglomerado de platino, así como su uso como agentes terapéuticos.

Antecedentes de la invención

20 Muchas técnicas clínicas y experimentales para tratar el cáncer, tales como terapia de citoquinas, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia celular y terapia fotodinámica (PDT) promueven la formación de especies de oxígeno reactivo (EOR). Las EOR incluyen aniones de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales de hidroxilo. Las EOR participan en la formación de otras especies reactivas. Por ejemplo, el superóxido reacciona con óxido nítrico para formar peroxinitrito y los radicales de hidroxilo eliminan átomos de hidrógeno de compuestos orgánicos para proporcionar radicales centrados en carbono reactivo. Las EOR provocan estrés oxidativo lo que lleva al daño celular y muerte celular.

25 Las citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral, provocan la muerte celular tumoral apoptótica mediante producción de radicales de hidroxilo intracelulares (Schulze-Osthoff *et al.*, J. Biol. Chem. 267:5317-23 (1992) y Yamauchi *et al.*, Cancer Res. 49:1671-5 (1989)). Muchos fármacos quimioterapéuticos inducen la producción de radicales de hidroxilo (Doroshov, J.H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4514-8 (1986).) con 56 de los 132 fármacos anticancerosos aprobados por la FDA que promueven el estrés oxidativo (Chen *et al.*, Mol. Interv. 7:147—56 (2007)). La radioterapia provoca la formación de radicales de hidroxilo mediante ionización de agua (Riley, P.A., Int. J. Radiat. Biol. 65:27-33 (1994)). En cuanto a la inmunoterapia celular, la producción de EOR por leucocitos humanos es un mecanismo importante en la muerte celular tumoral *in vitro* (Clark y Klebanoff, J. Exp. Med. 141:1442-7 (1975) y Ackermann *et al.*, Cancer Res. 49:52832 (1989)). En las anteriores técnicas, las EOR destruyen eficazmente células tumorales, sin embargo, las EOR también se depositan dentro de tejidos sanos durante la terapia anticáncer provocando, de este modo, sustanciales daños colaterales (Chen *et al.*, anteriormente citado).

35 En la PDT, se administra un agente fotosensibilizante a un sitio diana en un sujeto y, a continuación, se irradia con luz a una longitud de onda determinada, lo cual activa el agente e induce la producción de EOR para provocar toxicidad a las células y tejidos cercanos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de los EE.UU. n.º 2010/0262115). Las nanopartículas se pueden utilizar como agentes fotosensibilizantes y se acoplan normalmente con un agente quimioterapéutico para tratar cáncer. Sin embargo, muchas nanopartículas requieren iluminación ultravioleta (UV) que tenga una longitud de onda inferior a 400 nm para su activación. Por consiguiente, su uso en el cuidado de pacientes se ve excluido por el hecho de que la luz UV promueve cánceres, tales como melanomas y daño ocular incluido pinguéculas, cataratas y otros trastornos oculares.

Existe la necesidad de opciones terapéuticas capaces de proporcionar altas concentraciones de EOR para dirigirse a células mientras que minimicen el daño a tejidos sanos y otros efectos secundarios.

Compendio de la invención

50 La presente invención se dirige a nanopartículas que comprenden un óxido de metal y un conglomerado de platino, en donde el conglomerado de platino tiene una relación de altura con respecto a base superior a 1 en donde la nanopartícula es una partícula que tiene al menos una dimensión que es superior a 10 nm e inferior a 500 nm, y en donde el conglomerado de platino es un agregado de átomos de platino que comprende entre 1 y 100 nanopuntas de platino y en donde la relación de altura con respecto a base es la relación axial entre la altura y base del conglomerado de platino. En un aspecto, el conglomerado de platino sirve como co-catalizador en la formación de EOR. Opcionalmente, el conglomerado de platino comprende óxido de platino. Opcionalmente, la estructura de cristal del conglomerado de platino no es cúbica. También opcionalmente, la relación de superficie con respecto a

volumen del conglomerado de platino es superior a 1 nm^{-1} . El conglomerado de platino está injertado en el óxido de metal.

5 Opcionalmente, la nanopartícula comprende un óxido de metal seleccionado del grupo que consiste en óxido de tungsteno, óxido de titanio, óxido de zinc, óxido de cerio, óxido de hierro y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la nanopartícula puede comprender un óxido de tungsteno tal como trióxido de tungsteno o un óxido de titanio. Opcionalmente, la nanopartícula comprende trióxido de tungsteno que tiene una estructura de cristal ortorrómbica. En un aspecto, el diámetro de la nanopartícula es superior a aproximadamente 20 nm. Por ejemplo, el diámetro de la nanopartícula puede ser de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm.

10 La presente invención se refiere adicionalmente a una composición que comprende una nanopartícula descrita en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, hiperplásica o hiperproliferativa tal como cáncer.

La presente invención también se refiere a un método de producción de nanopartículas que comprende la formación de una mezcla de nanopartículas de óxido de metal y ácido cloroplatinico y, a continuación, alcalinizando la mezcla a un pH por encima de 10, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 12.

15 La presente invención también se refiere a un método de generación de radicales de hidroxilo que comprende irradiar una nanopartícula de la presente invención con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. En otro aspecto, se describe un método de terapia fotodinámica (PDT) que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula de la presente descripción a un sujeto que lo necesita e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400
20 nm para generar radicales de hidroxilo.

La presente descripción también proporciona un método de tratamiento de un trastorno neoplásico, hiperplásico o hiperproliferativo en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento a un sujeto e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. Se proporciona también un método de
25 tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento al sujeto e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. Además, se proporciona un método de inhibición de crecimiento de cáncer o metástasis, que comprende poner en contacto una célula cancerosa con una cantidad eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento e irradiar la
30 nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. El cáncer se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer ocular, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer esofágico y cáncer pulmonar.

En diversos aspectos, un método de uso de una nanopartícula de la presente descripción comprende irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda en un intervalo de aproximadamente 400 nm a
35 aproximadamente 750 nm o de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 1 mm. Las nanopartículas pueden administrarse a un sujeto que lo necesita mediante cualquiera de una cantidad de vías adecuadas, incluidas por vía intratumoral, intravenosa, intraocular, tópica o subcutánea.

El compendio anterior no pretende definir cada aspecto de la invención y otras características y ventajas de la presente descripción resultarán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada, incluidos los dibujos. La
40 presente descripción pretende estar relacionada como un documento unificado y debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en el presente documento, incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma oración, párrafo o sección de la presente descripción. Además, la descripción incluye, como aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención con un alcance más reducido de algún modo que las variaciones mencionadas específicamente anteriormente. Con
45 respecto a los aspectos de la descripción descritos o reivindicados con "un" o "una" debe entenderse que estos términos significan "uno o más" a menos que el contexto requiera sin ambigüedades un significado más restringido. Con respecto a elementos descritos como uno o más dentro de un conjunto, debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones dentro del conjunto. Si los aspectos de la descripción se describen como "que comprenden"
50 una característica, las realizaciones también se contemplan que "consisten en" o "consisten esencialmente en" la característica. Características y variaciones adicionales de la descripción resultarán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la totalidad de la presente solicitud y todas tales características se prevén como aspectos de la divulgación.

Breve descripción de los dibujos

55 Las Figuras 1A-1B representan una ilustración esquemática de nanopartículas de WO_3/Pt ejemplares. La Figura 1A representa una ilustración esquemática de reacciones catalíticas. La Figura 1B muestra un diagrama de un injerto de conglomerado de platino ejemplar.

Las Figuras 2A-2B representan la microscopía de electrones de nanopartículas de WO_3 con y sin injertos de conglomerados de platino. La Figura 2A muestra imágenes de HR-TEM de nanopartículas de WO_3 . La Figura 2B muestra HR-TEM de nanopartículas de WO_3/Pt . Los injertos de conglomerados de platino se indican con flechas.

5 La Figura 3 representa la utilización del sustrato de oxígeno por (A) una solución de MeOH al 0,1 %, (B) una suspensión de nanopartículas de WO_3/Pt en H_2O y (C) una suspensión de 0,5 mg/ml de nanopartículas de WO_3/Pt y MeOH al 0,1 % en agua. Se representa gráficamente oxígeno disuelto (mg/l) en el eje de ordenadas, mientras que el eje de abscisas enumera el tiempo y el inicio de exposición a luz se indica con una flecha.

10 Las Figuras 4A-4B representan la capacidad de las nanopartículas para producir radicales de hidroxilo. La intensidad de fluorescencia de 7-hidroxicumarina, un producto fluorescente de cumarina y radicales de hidroxilo, se representa con un gráfico en el eje de ordenadas y el eje de abscisas enumera el tiempo. La Figura 4A muestra la cinética del aspecto de fluorescencia de la 7-hidroxicumarina de nanopartículas de WO_3/Pt preparadas a un pH alcalino (pH de aproximadamente 12). La Figura 4B muestra la cinética de fluorescencia de 7-hidroxicumarina de nanopartículas de WO_3/Pt preparadas a un pH alcalino (rombos), nanopartículas de WO_3/Pt preparadas a un pH de aproximadamente 2 (círculos) y nanopartículas de WO_3 sin modificación (triángulos).

15 La Figura 5 representa la utilización del sustrato de oxígeno por (A) una suspensión de 0,5 mg/ml de nanopartículas y glucosa al 0,1 % en agua expuesta a oscuridad solo, (B) una solución de glucosa al 0,1 % sin nanopartículas, (C) nanopartículas iluminadas en ausencia de glucosa, (D) una suspensión de nanopartículas y glucosa y (E) una suspensión de nanopartículas, glucosa y 100 mM de t-butanol. Se representa gráficamente oxígeno disuelto (mg/l) en el eje de ordenadas, mientras que el eje de abscisas enumera el tiempo y el inicio de exposición a luz se indica con una flecha.

20

Las Figuras 6A-6H representan micrográficos de nanopartículas de WO_3/Pt en asociación con células tumorales. La Figura 6A muestra microscopía de campo brillante convencional (aumento x 100) de células tumorales sin tratar. La Figura 6B muestra una microscopía de campo brillante convencional (ampliación x 100) de células tumorales tratadas con nanopartículas. La Figura 6C muestra microscopía potenciada con plasmón de superficie (ampliación x 700) de células cultivadas en ausencia de nanopartículas. La Figura 6D muestra microscopía potenciada con plasmón de superficie (ampliación x 700) de células incubadas con nanopartículas. La Figura 6E muestra microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una célula tumoral sin tratar. La Figura 6F muestra TEM de una célula tumoral tratada con nanopartículas que no se ha expuesto a la luz. La Figura 6G muestra TEM de una célula tumoral tratada con nanopartículas que se ha expuesto a terapia con luz durante 2 horas. La Figura 6H muestra TEM de una célula tumoral tratada con nanopartículas expuesta a terapia con luz durante 5 horas.

25

30

Las Figuras 7A-7J representan la caracterización de respuestas biológicas a nanopartículas. La Figura 7A muestra células 4T1 tratadas con nanopartículas marcadas con dihidrorodamina 6G incubadas durante 30 minutos en la oscuridad. La Figura 7B muestra células 4T1 tratadas con nanopartículas marcadas con dihidrorodamina 6G incubadas durante 30 minutos con luz visible ($\sim 0,6 \text{ lm/cm}^2$). La Figura 7C muestra la formación de peróxido lipídico en células tumorales tratadas con nanopartículas expuestas a oscuridad solo. La Figura 7D muestra la formación de peróxido lipídico en células tumorales tratadas con nanopartículas después de 20 minutos de exposición a la luz. La Figura 7E muestra tinción de 4HNE en células tumorales tratadas con nanopartículas expuestas a oscuridad solo. La Figura 7F muestra tinción de 4HNE en células tumorales tratadas con nanopartículas después de 20 minutos de exposición a la luz. La Figura 7G muestra tinción de rojo Lyso-ID en células tumorales tratadas con nanopartículas expuestas a oscuridad solo. La Figura 7H muestra tinción de rojo Lyso-ID en células tumorales tratadas con nanopartículas después de 20 minutos de exposición a la luz. La Figura 7I muestra marcaje caspasa 3/7 activada en células tumorales tratadas con nanopartículas expuestas a oscuridad solo. La Figura 7J muestra marcaje caspasa 3/7 activada en células tumorales tratadas con nanopartículas después de 20 minutos de exposición a la luz.

35

40

Las Figuras 8A-8E representan la detección de producción de aldehído dependiente de la luz dentro de células que contienen nanopartículas de WO_3/Pt . La Figura 8A muestra un micrográfico de células 4T1 tratadas con luz durante 3 horas. Los conglomerados oscuros se corresponden con regiones ricas en nanopartículas. La Figura 8B muestra las mismas células usando citoquímica de NAH para observar los sitios reactivos a aldehído. La Figura 8C muestra una imagen de fluorescencia de células 4T1 incubadas en la oscuridad sin nanopartículas. La Figura 8D muestra un micrográfico de fluorescencia de células tratadas con luz durante 3 horas, pero en ausencia de nanopartículas. La Figura 8E muestra un micrográfico de fluorescencia de células 4T1 tratadas con nanopartículas incubadas durante 3 horas en la oscuridad.

45

50

Las Figuras 9A-9E representan fotografías externas de ojos de murinos después de su tratamiento con células tumorales con o sin nanopartículas inyectadas en el ojo izquierdo del animal. La Figura 9A muestra animales sin tratamiento. La Figura 9B muestra animales tratados con células 4T1. La Figura 9C muestra animales tratados con células 4T1 y nanopartículas de WO_3/Pt y luz ambiente. La Figura 9D muestra animales tratados con células 4T1 y nanopartículas de WO_3/Pt y oscuridad solo. La Figura 9E muestra animales tratados con células 4T1 y nanopartículas de WO_3 y luz ambiente.

55

Las Figuras 10A-10C representa secciones de ojos después de su tratamiento con células tumorales con o sin nanopartículas. "T" representa áreas de crecimiento tumoral. La Figura 10A muestra una imagen de baja potencia de

una sección de ojo sagital teñida con H/E en un animal de control (sin tratamiento). La Figura 10B muestra una imagen de baja potencia de una sección de ojo sagital teñida con H/E en un ojo tratado con células tumorales marcadas con nanopartículas e iluminación con luz. La Figura 10C muestra un ojo tratado con células tumorales solo.

- 5 La Figura 11 representa la curva de supervivencia de ratones tratados con células 4T1 (n=22) (línea punteada), ratones expuestos a células 4T1 y nanopartículas y terapia con luz (n=24) (línea continua) y ratones tratados con nanopartículas solo, sin administración de células tumorales (n=16) (línea de rayas horizontal). Las curvas de supervivencia difieren significativamente, como se ha considerado mediante ensayos estadísticos de Kaplan-Meier ($P < 0,0001$), para la comparación de cada par.
- 10 La Figura 12 representa curvas de supervivencia de ratones después de su tratamiento con nanopartículas de WO_3/Pt . La supervivencia de los ratones tratados con células tumorales solo (n=22) (línea punteada) no fue significativamente distinta de la de células 4T1 tratadas con nanopartículas en ratones mantenidos en la oscuridad (n=16) (línea continua).

Descripción detallada de la invención

- 15 La presente descripción proporciona nanopartículas que comprenden un óxido de metal y un conglomerado de platino, en donde el conglomerado de platino tiene una relación de altura con respecto a base superior a 1. Las nanopartículas se pueden usar para generar EOR, tales como radicales de hidroxilo, irradiando las nanopartículas con radiación que tiene una longitud de onda superior a o igual a aproximadamente 400 nm. Las nanopartículas de la presente descripción tienen numerosas ventajas en comparación con las terapias convencionales, incluidas tanto
- 20 ventajas físico-químicas como ventajas clínicas. En primer lugar, las nanopartículas centran su efecto terapéutico directamente sobre una célula diana en lugar de células colindantes, debido a la alta reactividad de los radicales de hidroxilo y pequeño radio de difusión minimizando, de este modo, el daño a células sanas. Las nanopartículas no fotoblanquean y, de este modo, se pueden utilizar repetidamente durante períodos prolongados de tiempo. Además, las nanopartículas muestran una actividad química superior que los reactivos de PDT actuales y tienen grandes secciones transversales de absorción de luz.
- 25

Las nanopartículas proporcionan ventajas clínicas en que evitan muchos de los problemas que limitan la eficacia terapéutica de otros tratamientos anticáncer. Las partículas no se ven afectadas de forma adversa por el microentorno tumoral. Las nanopartículas tampoco son susceptibles a mecanismos de resistencia multifármaco. Puesto que las nanopartículas pueden activarse mediante luz visible, que no es mutagénica, en lugar de la radiación UV, el uso de las nanopartículas no aumenta el riesgo de tumores secundarios. A diferencia de otros agentes quimioterapéuticos, las nanopartículas requieren mínimos reactivos permitiendo que se usen altas dosis en el cuidado del paciente, entre las que se incluyen para el tratamiento de pacientes que están muy enfermos. Las nanopartículas también son rentables de fabricar y administrar.

30

Las siguientes definiciones pueden resultar útiles para ayudar al profesional capacitado en la comprensión de la descripción. A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos que se usan en la presente descripción deben tener los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica.

35

El término "nanopartícula" se refiere a una partícula que tiene al menos una dimensión, tal como diámetro o circunferencia, que es superior a aproximadamente 10 nm e inferior a aproximadamente 500 nm. Una nanopartícula puede ser cualquiera de un número de formas geométricas, por ejemplo, esferas, pirámides, cubos, o varas.

40

El término "óxido" se refiere a un compuesto químico que contiene, al menos, un átomo de oxígeno y al menos un átomo de otro elemento, por ejemplo, un metal. El término engloba compuestos químicos que contienen un átomo de oxígeno, es decir, monóxidos y más de un átomo de oxígeno, por ejemplo, dióxidos, trióxidos y tetraóxidos.

El término "conglomerado de platino" se refiere a un agregado de átomos de platino que comprende entre 1 y 100 nanopuntas de platino, opcionalmente, entre 5 y 25 nanopuntas de platino.

45

Cada nanopunta de platino comprende más de 60 átomos de platino unidos mediante unión metálica. Las nanopuntas pueden tener una parte superior plana o puntiaguda.

La "relación de altura con respecto a base" se refiere a la relación axial entre la altura y base de un conglomerado de platino. La "altura" se define como la longitud del conglomerado de platino desde el punto de unión entre el conglomerado de platino y un óxido de metal al ápice del conglomerado de platino. La "base" se define como la anchura del conglomerado de platino en el punto de unión entre el conglomerado de platino y un óxido de metal.

50

El término "injerto" se refiere a un conglomerado de platino unido a la superficie de una molécula de óxido de metal, por ejemplo, desde los electrones de banda de valencia del platino y el óxido de metal que forman una unión compartida entre los electrones de banda de valencia. Se puede injertar un conglomerado de platino a un óxido de metal mediante el uso de métodos de deposición conocidos en la técnica.

55

Los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" dependen de la afección de un sujeto y el/los componente(s) específico(s) administrado(s). Los términos se refieren a una cantidad eficaz para conseguir un efecto biológico deseado, por ejemplo, clínico. Una cantidad terapéuticamente eficaz varía con la naturaleza de la enfermedad que está siendo tratada, el intervalo de tiempo que se desea esa actividad y la edad y condiciones del sujeto. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula o composición de la invención es una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células hiperproliferativas, evitar la metástasis de células cancerosas y/o dar como resultado la destrucción de células cancerosas.

La presente descripción proporciona una nanopartícula que comprende un óxido de metal y un conglomerado de platino, en donde el conglomerado de platino tiene una relación de altura con respecto a base superior a 1. En diversos aspectos, la relación de altura con respecto a base puede ser de entre 1 y 2, de entre 2 y 4, o de entre 2,5 y 5. Por ejemplo, la relación de altura con respecto a base (altura:base) puede ser de aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2:1, aproximadamente 1,3:1, aproximadamente 1,4:1, aproximadamente 1,5:1, aproximadamente 1,6:1, aproximadamente 1,7:1, aproximadamente 1,8:1, aproximadamente 1,9:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 3,5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 4,5:1 o aproximadamente 5:1. El platino tiene normalmente una estructura de cristal cúbica centrada en las caras. Sin embargo, por encima de las dimensiones de la célula unitaria, el platino puede tomar otras formas, tales como esférica. Puesto que la altura del conglomerado de platino sobre la superficie de la nanopartícula de óxido de metal de la presente descripción es superior a su base, el platino depositado sobre el óxido de metal tiene una estructura alargada, más similar a una nanopunta u obelisco. En un aspecto, la relación de superficie con respecto a volumen mínima del conglomerado de platino es superior a 1 nm^{-1} , por ejemplo, aproximadamente 2 nm^{-1} . En diversos aspectos, el conglomerado de platino puede comprender un óxido de platino, por ejemplo, PtO , PtO_2 , PtO_3 o Pt_3O_4 .

Las nanopartículas de la presente descripción no requieren radiación ultravioleta y pueden activarse con luz visible, es decir, luz que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm, puesto que la diferencia energética entre las bandas de valencia y de conducción es pequeña. En un aspecto, las nanopartículas se activan mediante irradiación con luz que tiene una longitud de onda en un intervalo de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 750 nm, por ejemplo, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 700 nm, de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 500 nm, o de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 450 nm. En otro aspecto, las nanopartículas pueden activarse con luz que tiene una longitud de onda en el intervalo rojo o infrarrojo, es decir, de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 1 mm y, de este modo, permiten la destrucción del tumor a profundidades superiores en tejidos opacos. Puesto que las nanopartículas no requieren luz UV para su activación, evitan los efectos dañinos de la radiación UV y pueden activarse selectivamente mediante el uso de luz ambiente. Por ejemplo, las nanopartículas pueden irradiarse mediante luz desde una fuente exterior, por ejemplo, una lámpara o diodo emisor de luz (LED) o internamente, por ejemplo, mediante el uso de un endoscopio.

En un aspecto, el conglomerado de platino es un co-catalizador en la generación de EOR. Como se muestra en la Figura 1A, la luz visible promueve un electrón desde la banda de valencia del óxido de metal a su banda de conducción creando, de este modo, un hueco de banda de valencia. Los electrones de banda de conducción se acumulan en el conglomerado de platino, el cual cataliza la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno y, a continuación, en radicales de hidroxilo. Los huecos de banda de valencia migran a la superficie de la nanopartícula, donde eliminan electrones del agua, aniones de hidróxido o moléculas orgánicas para crear radicales de hidroxilo y degradar compuestos orgánicos.

En un aspecto, una nanopartícula de acuerdo con la presente descripción comprende un óxido de metal seleccionado del grupo que consiste en óxido de tungsteno, óxido de titanio, óxido de zinc, óxido de cerio, óxido de hierro y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el óxido de metal es óxido de tungsteno, por ejemplo, WO , WO_2 , WO_3 , W_2O_3 , W_4O_5 o W_4O_{11} . En una realización, el óxido de metal es trióxido de tungsteno (WO_3) que tiene, opcionalmente, una estructura de cristal ortorrómbica o una estructura de cristal tetragonal. Las nanopartículas de trióxido de tungsteno cargadas con platino (WO_3/Pt), un semiconductor de óxido de metal y un co-catalizador de metal, muestran actividad fotocatalítica (Abe *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 130:7780-1 (2008)). Los huecos de banda de valencia de WO_3 tiene un alto poder oxidativo $+3 \text{ V}_{\text{NHE}}$ mientras que el Pt sirve como co-catalizador en la reducción de multielectrones de oxígeno a radical de hidroxilo. Las nanopartículas de WO_3 no tienen o tienen muy pocos efectos tóxicos (Lanone *et al.*, Part. Fibre Toxicol. 6:14 (2009) y Hasegawa *et al.*, J. Appl. Toxicol. 32:72-80 (2012)) y WO_3 tiene un DL_{50} oral de 1059 mg/kg. En otro aspecto, el óxido de metal es óxido de titanio, por ejemplo, TiO , TiO_2 , Ti_2O_3 o TiO_3 .

En un aspecto, la nanopartícula tiene un diámetro superior a aproximadamente 20 nm. Por ejemplo, la nanopartícula puede tener un diámetro superior a aproximadamente 25 nm, superior a aproximadamente 30 nm, superior a aproximadamente 35 nm, superior a aproximadamente 40 nm, superior a aproximadamente 45 nm, superior a aproximadamente 50 nm, superior a aproximadamente 55 nm, superior a aproximadamente 60 nm, superior a aproximadamente 65 nm, superior a aproximadamente 70 nm, superior a aproximadamente 75 nm, superior a aproximadamente 80 nm, superior a aproximadamente 85 nm, superior a aproximadamente 90 nm, superior a aproximadamente 95 nm o superior a aproximadamente 100 nm. En diversos aspectos, el diámetro de las nanopartículas es de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 60 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 80 nm o de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm. En diversos aspectos, el

diámetro de las nanopartículas es de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 51 nm, aproximadamente 52 nm, aproximadamente 53 nm, aproximadamente 54 nm, aproximadamente 55 nm, aproximadamente 56 nm, aproximadamente 57 nm, aproximadamente 58 nm, aproximadamente 59 nm o aproximadamente 60 nm. En un aspecto, la nanopartícula es esférica. En otro aspecto, la nanopartícula tiene forma de vara.

5 En un aspecto, la nanopartícula comprende adicionalmente una modificación superficial, por ejemplo, unir un ligando para mejorar el suministro de la nanopartícula a un sitio diana. Ejemplos de ligandos incluyen, aunque no de forma limitante, folato y el anticuerpo de anti-molécula de adhesión celular epitelial (anti-EpCAM). En un aspecto, la nanopartícula comprende adicionalmente la modificación de grupos hidroxilo de superficie, por ejemplo, para unir los grupos hidroxilo de superficie al grupo de ácido carboxílico de ácido fólico, por ejemplo, mediante esterificación de Fischer para suministrar la nanopartícula a una célula cancerosa que expresa un receptor de folato, tal como una célula de cáncer de mama. El enlace covalente a la nanopartícula mediante el resto de γ -carboxilo de folato no afecta la alta afinidad de unión del folato al receptor de folato y tampoco interfiere con la producción de radicales de hidroxilo de las nanopartículas permitiendo el suministro dirigido de la nanopartícula a células cancerosas *in vivo*. En otro ejemplo, la nanopartícula comprende adicionalmente un anticuerpo anti-EpCAM unido a la superficie de la nanopartícula, para suministrar la nanopartícula a una célula cancerosa que sobreexpresa moléculas EpCAM. Opcionalmente, la nanopartícula comprende adicionalmente un ligando unido a la superficie de la nanopartícula mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador heterobifuncional. Opcionalmente, la nanopartícula comprende adicionalmente una modificación superficial para proporcionar una interfaz biocompatible, por ejemplo, un recubrimiento de poli-L-lisina o un recubrimiento de polietilenglicol. En un aspecto, la interfaz se adsorbe a la superficie de la nanopartícula. En otro aspecto, la interfaz está covalentemente unida a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, el ligado tal como un grupo folato o anticuerpo anti-EpCAM está unido a la interfaz biocompatible.

La presente descripción también proporciona un método de fabricación de nanopartículas que comprende un óxido de metal y un conglomerado de platino. En un aspecto, el conglomerado de platino está injertado en el óxido de metal. La Figura 1B muestra un diagrama de un conglomerado de platino ejemplar. Un conglomerado de platino está comprendido de una pluralidad de nanopuntas de platino, opcionalmente, entre 1 a 100 nanopuntas o entre 5 y 25 nanopuntas. En un aspecto, una nanopunta puede tener una anchura de base de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 10 nm, por ejemplo, aproximadamente 2 nm y una altura de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 nm, por ejemplo, aproximadamente 10 nm. Las nanopuntas y conglomerados de platino son fotocátodos estructuralmente únicos.

Un método de fabricación de nanopartículas de acuerdo con la presente descripción comprende la formación de una mezcla de nanopartículas de óxido de metal y ácido cloroplátnico y, a continuación, alcalinizando la mezcla a un pH por encima de 10 para injertar conglomerados de platino sobre las nanopartículas. Por ejemplo, la mezcla puede alcalinizarse con NaOH a un pH por encima de 10, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 12. Se conoce que altos valores de pH disuelven algún óxido de metal, por ejemplo, trióxido de tungsteno, cristales. En un aspecto, un método de fabricación de nanopartículas de acuerdo con la presente descripción comprende exponer nanopartículas de óxido de metal a un pH por encima de 10 durante justo el tiempo suficiente para fotodepositar el platino y, a continuación, dializar exhaustivamente la muestra para obtener un pH neutro. En otro aspecto, un método de fabricación de nanopartículas comprende usar un agente reductor, por ejemplo, borohidrato de sodio y reducir las nanopartículas en una corriente de H_2 a 480 °C durante 15 horas para injertar conglomerados de platino sobre las nanopartículas.

La presente descripción también proporciona una composición que comprende una nanopartícula descrita en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad neoplásica, hiperplásica o hiperproliferativa tal como cáncer. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no están limitados a, agua, solución salina, tampón fosfato salino y tampones comerciales. Preferentemente, el vehículo es estéril. Otros excipientes, incluidos agentes tamponadores, agentes dispersantes y conservantes, con conocidos en la técnica y pueden incluirse en la composición. Ejemplos adicionales de componentes que pueden emplearse en las composiciones se presentan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. (1980) y 20ª Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, Pa. Una composición puede ser cualquier forma de dosificación adecuada que incluye, aunque no de forma limitada a, comprimidos, cápsulas, implantes, formulaciones de liberación prolongada, líquidos, parches, pastillas para chupar, cremas, ungüentos, lociones, aerosoles y gotas oculares.

La presente descripción proporciona métodos de uso de las nanopartículas descritas en el presente documento. En un aspecto, un método de generación de radicales de hidroxilo que comprende irradiar una nanopartícula de la presente descripción con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. En otro aspecto, un método de terapia fotodinámica (PDT) comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula de la presente descripción a un sujeto que lo necesita e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm para generar radicales de hidroxilo.

También se describe un método de tratamiento de un trastorno neoplásico, hiperplásico o hiperproliferativo en un sujeto que lo necesita que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento al sujeto e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una

longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. En un aspecto adicional, se proporciona también un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento al sujeto e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. En un aspecto adicional, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer ocular, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer esofágico y cáncer pulmonar. Un experto en la técnica apreciará que el tratamiento de un cáncer no requiere la completa erradicación del cáncer. Se contempla cualquier respuesta fisiológica beneficiosa, tal como encogimiento del tumor, destrucción de células tumorales, reducción o detención de metástasis, reducción en marcadores de células cancerosas, alivio de los síntomas y similares. El uso de nanopartículas como agente anticanceroso difiere de las aplicaciones de nanopartículas convencionales en que las nanopartículas de la presente divulgación pueden ser los agentes terapéuticos por sí mismas, no simplemente un vehículo o marcador magnético para otro agente (Zamboni *et al.*, Clin. Cancer Res. 18:3229—41 (2012)). En un aspecto, un método de inhibición de crecimiento de cáncer o metástasis comprende poner en contacto una célula cancerosa con una cantidad eficaz de una nanopartícula descrita en el presente documento e irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda superior a aproximadamente 400 nm. Cuando se usa para tratar cáncer, las nanopartículas también pueden localizarse y activarse en sitios tumorales en lugar de la activación sistémica que expondría órganos vitales. Las EOR se producen dentro de las células tumorales, dando como resultado toxicidad selectiva y daño limitado a tejido sano evitando, de este modo, los efectos secundarios de las terapias anticáncer convencionales.

También se describe una cantidad terapéuticamente eficaz de una nanopartícula o composición descrita en el presente documento, formulada normalmente de acuerdo con la práctica farmacéutica, administrada a un sujeto que la necesita. Un régimen de administración particular para un sujeto particular dependerá, en parte, de la nanopartícula o composición, la cantidad administrada, la vía de administración y la causa y grado de cualquier efecto secundario. La cantidad administrada a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) de acuerdo con la invención debe ser suficiente para efectuar la respuesta deseada durante un lapso de tiempo razonable. La dosificación depende normalmente de la vía, tiempos y frecuencia de administración. Por consiguiente, un clínico titula la dosificación y modifica la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

Solamente a modo de ilustración, los métodos de la presente descripción comprenden la administración, por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más de composición de nanopartículas basándose en el peso del tumor o sujeto, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación varía desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg, de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg. El período de tratamiento dependerá de la afección particular y puede durar de un día a varios días, semanas, meses o años. Una nanopartícula o composición descrita en el presente documento se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 900 mg por dosis, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 30 mg por dosis, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 25 mg por dosis, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 40 mg por dosis, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg por dosis o de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 250 mg por dosis. Por ejemplo, las nanopartículas pueden administrarse, por dosis, en una cantidad de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800 o 900 mg, incluidas todas las dosis entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 900 mg. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio, aunque puede haber casos individuales en los que estén justificadas dosis superiores o inferiores y estas se encuentran dentro del alcance de la presente descripción. En práctica, un clínico determina el régimen de dosificación real que es el más adecuado para un sujeto individual, que puede variar según la edad, peso, afección y respuesta del sujeto particular.

Métodos adecuados de administrar una composición fisiológicamente aceptable, tal como una composición que comprende una nanopartícula descrita en el presente documento, son bien conocidos en la técnica. Aunque se puede usar más de una vía para administrar un compuesto, una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Dependiendo de las circunstancias, una composición que comprende las nanopartículas descritas en el presente documento se introduce en sitios tumorales, se aplica o instila en cavidades corporales, se absorbe a través de la piel u ojo o membranas mucosas, se inhala y/o introduce en la circulación. Las nanopartículas pueden inyectarse por vía intravenosa, dando como resultado la absorción sistémica y, a continuación, activándose selectivamente solo en los sitios tumorales. De modo alternativo, las nanopartículas pueden administrarse localmente poniendo en contacto directamente las células tumorales con las nanopartículas. Por ejemplo, en determinadas circunstancias, será deseable suministrar la composición mediante inyección o infusión por medio intravenoso, intratumoral, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, intralesional, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, transdérmico, entérico, tópico, sublingual, uretral, vaginal o rectal; mediante sistemas controlados retardados, sostenidos o, de otro modo, modificados; o

mediante dispositivos de implante. Si se desea, la composición se administra regionalmente mediante administración intratumoral, administración intraocular, administración intratecal, administración intracerebral (intraparenquimatosa), administración intracerebroventricular, administración tópica, administración subcutánea o intraarterial o administración intravenosa que se dirige a la región de interés. De modo alternativo, la composición se administra localmente mediante el implante de una matriz, membrana, esponja u otro material adecuado sobre el cual se han absorbido o encapsulado nanopartículas. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo, en un aspecto, se implanta en cualquier tejido u órgano adecuado y, el suministro del compuesto deseado es, por ejemplo, mediante difusión, bolo de liberación controlada o administración continua.

En un aspecto de la descripción, las nanopartículas se pueden administrar intraocularmente para tratar enfermedades oculares que incluyen retinoblastoma, linfoma, meduloeptelioma, hemangioma, melanoma intraocular y metástasis oculares. Los cánceres oculares se encuentran entre los más complicados de tratar y se tratan, normalmente, con cirugía, incluida la extirpación del ojo. Las nanopartículas de la presente descripción se pueden usar para suministrar selectivamente altos niveles de EOR para encoger el tumor y proporcionar una alternativa a la cirugía. En otro aspecto, las nanopartículas pueden administrarse por vía tópica, transdérmica o subcutánea para tratar enfermedades de la piel. Por ejemplos, las nanopartículas se pueden usar para tratar cánceres de la piel incluidos cánceres basales y escamosos, así como melanoma. Adicionalmente, las nanopartículas se pueden usar para tratar trastornos de la piel tales como esclerosis sistémica, la cual es fibrosis de la piel. La enfermedad es extremadamente complicada de controlar y, a menudo, se basa en inmunosupresores para detener el crecimiento y la activación de miofibroblastos. Las nanopartículas se dirigen, opcionalmente, para inhibir los miofibroblastos y controlar el trastorno. Las nanopartículas pueden activarse fácilmente y de forma no invasiva con luz visible en los sitios diana sobre el ojo o la piel evitando, de este modo, los efectos dañinos de la radiación UV. En otro aspecto, las nanopartículas se usan para tratar infecciones localizadas.

Después de la administración de las nanopartículas, puede haber un período de incubación de al menos varias horas, por ejemplo, de 2 a 4 horas o más, para permitir la absorción de las nanopartículas en las células diana, antes de irradiarse las nanopartículas. La dosis de irradiación puede ser de entre aproximadamente 1 J/cm² y 100 J/cm², por ejemplo, de entre aproximadamente 1 J/cm² y aproximadamente 60 J/cm², de entre aproximadamente 50 J/cm² y aproximadamente 60 J/cm² o de entre aproximadamente 1 J/cm² y aproximadamente 5 J/cm².

Dependiendo de la afección a tratar y la dosis, las nanopartículas se pueden irradiar con luz durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 120 minutos, entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 60 minutos o entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 90 minutos. Por ejemplo, las nanopartículas pueden irradiarse durante aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos o aproximadamente 120 minutos. Puesto que las nanopartículas no se metabolizan o, de otro modo, se degradan y no fotoblanquean, las nanopartículas también pueden irradiarse con luz repetidamente después de una única dosis. En diversos aspectos, puede haber intervalos de varias horas a días entre cada irradiación. Por ejemplo, en un método de tratamiento de cáncer, las nanopartículas pueden administrarse a un sujeto y, a continuación, irradiarse una, dos, tres, cuatro, cinco o seis veces diariamente o semanalmente después de una única dosis. Se pueden administrar dosis adicionales de las nanopartículas para mantener una concentración deseada en el sitio diana al sujeto según se necesite durante el transcurso del tratamiento.

En un aspecto de la descripción, las nanopartículas pueden unirse a un resto de direccionamiento específico de una célula tumoral, tal como una proteína de unión a antígeno, (por ejemplo, anti-EpCAM) o un folato. Las proteínas de unión a antígeno incluyen, aunque no de forma limitante, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, análogos de anticuerpos y proteínas de fusión que se unen a un antígeno de célula tumoral específico.

Además de usarse solas como agentes terapéuticos, también se describe que las nanopartículas y composiciones de la presente invención se pueden usar en combinación con otras terapias. Ejemplos de terapias antitumor que se pueden usar en combinación con las nanopartículas y composiciones incluyen cirugía, radioterapia (por ejemplo, radiación gamma, radioterapia de haz neutrones, radioterapia de haz de electrones, terapia de protones, braquiterapia e isótopos radioactivos sistémicos), terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferón, interleucina, factor de necrosis tumoral (TNF), hipertermia y crioterapia), agentes para atenuar cualquier efecto adverso (por ejemplo, antieméticos), terapia génica, virus oncolíticos y cualquier otro agente terapéutico. En un aspecto, la supervivencia animal puede mejorarse combinando las nanopartículas con un agente terapéutico que inhibe la capacidad de las células tumorales en mitigar el estrés oxidativo.

Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden administrarse con una nanopartícula o composición de la presente descripción incluyen, aunque no de forma limitante, agentes antitumorales, agentes antineoplásicos, profármacos, agentes desestabilizadores del lisosoma (por ejemplo, cloroquina), analgésicos, anestésicos, analépticos, agentes adrenérgicos, agentes bloqueadores adrenérgicos, adrenolíticos, adrenocorticoides, adrenomiméticos, agentes anticolinérgicos, anticolinesterasas, anticonvulsivos, agentes alquilantes, alcaloides, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, anorexigénicos, antiácidos, antidiarreicos, antidotos, antifolatos, antipiréticos, agentes antirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos,

antibióticos, anticoagulantes, antidepresivos, antiepilépticos, antibacterianos, antifúngicos, agentes antifibróticos, agentes antiinfecciosos, agentes antiparasitarios, antihistaminas, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antineoplásicos, agentes antiprotozoicos, agentes antivirales, fármacos cardiacos, sedantes ansiolíticos, agentes de bloqueo de beta-adrenoceptores, corticosteroides, antitusivos, dopaminérgicos, hemostáticos, agentes hematológicos, hipnóticos, agentes inmunológicos, muscarínicos, fármacos neurológicos, péptidos bioactivos, hormonas esteroideas, ácidos nucleicos, vacunas, fármacos antiprotozoarios, barbitúricos, sustancias fotosensibilizantes, parasimpaticomiméticos, prostaglandinas, radiofarmacéuticos, sedantes, estimulantes, simpaticomiméticos, vitaminas, xantinas, factores de crecimiento, hormonas, agentes antiprionicos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un agente antitumoral seleccionado del grupo que consiste en inhibidor de aromatasa; un antiestrógeno; un antiandrógeno; un agonista de gonadorrelina; un inhibidor de topoisomerasa I, un inhibidor de topoisomerasa II; un agente activo a microtúbulos; un agente alquilante; un retinoide, un carotenoide o un tocoferol; un inhibidor de ciclooxigenasa; un inhibidor MMP; un inhibidor mTOR; un antimetabolito; un compuesto de platino; un inhibidor de metionina aminopeptidasa; un bifosfonato; un anticuerpo antiproliferativo; un inhibidor de heparanasa; un inhibidor de isoformas oncogénicas Ras; un inhibidor de telomerasa; un inhibidor de proteasoma; un inhibidor de Flt-3; un inhibidor de Hsp90; un inhibidor de proteína del huso de quinesina; un inhibidor MEK; un antibiótico antitumoral; una nitrosourea; un compuesto que se dirige a/hace disminuir la actividad quinasa de proteínas o lípidos, un compuesto que se dirige/hace disminuir la actividad fosfatasa de proteínas o lípidos, cualquier compuesto antiangiogénico y combinaciones de los mismos. Ejemplos específicos de agentes antitumorales incluyen, aunque no de forma limitante, azacitidina, axatioprina, bevacizumab, bleomicina, capecitabina, carboplatino, clorabucil, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, daunorubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina, epirubicina, etoposido, fenretinida, fluoroacil, gemcitabina, herceptin, idarrubicina, mecloretamina, melfalan, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, tafluposido, teniposido, tioguanina, ácido retinoico, valrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, inhibidores del receptor tirosina quinasa y combinaciones de los mismos. Se conocen en la técnica ejemplos adicionales de agentes antitumorales y otros agentes terapéuticos.

En un aspecto, las nanopartículas o composiciones de la presente descripción ejercen su actividad antitumoral mediante la inducción de apoptosis o necrosis. Las células apoptóticas pueden identificarse mediante marcadores histológicos tales como condensación nuclear y citoplásmica y fragmentación celular. Las células necróticas pueden identificarse mediante marcadores histológicos tales como hinchazón celular y de organelos, floculación de cromatina, pérdida de basofilos nucleares, estructura citoplásmica degradada, función de organelos alterada, permeabilidad de membrana aumentada y citólisis. Un mecanismo para inducir la apoptosis y/o necrosis implica la activación de caspasas iniciadoras (por ejemplo, caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10), caspasas efectoras (por ejemplo, caspasa-3, caspasa-6) y también caspasas proinflamatorias (por ejemplo, caspasa-1 y caspasa-13). El papel de las caspasas proinflamatorias en la muerte celular está probablemente relacionado con su capacidad de inducir respuestas inflamatorias del hospedador *in vivo*. La actividad de la caspasa puede, por lo tanto, analizarse como una medida de la apoptosis y/o necrosis. Otros métodos para detectar la muerte celular mediante apoptosis y/o necrosis conocidos en la técnica también son adecuados para medir la actividad antitumoral de las nanopartículas o composiciones de la presente descripción, incluidos ensayos de marcado de final de corte de dUTP mediados por Tdt (TUNEL), ensayos de marcado final *in situ* (ISEL), ensayos de escalonado de ADN, ensayos de fragmentación de ADN, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)/citometría de flujo, análisis microscópico, ensayos de tinción celular (por ejemplo, usando azul de tripano, yoduro de propidio, 7-actinomicina D, anexina V, Hoescht, diacetato de fluoresceína verde, DAPI y/u otros tintes conocidos en la técnica) y ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

También puede analizarse el crecimiento tumoral para determinar la actividad antitumoral de las nanopartículas de la presente descripción. Se puede evaluar la masa, volumen y/o longitud del tumor mediante el uso de métodos conocidos en la técnica tales como calibradores, formación de imágenes por ultrasonido, formación de imágenes por tomografía computarizada (CT), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), formación de imágenes ópticas (por ejemplo, bioluminiscencia y/o formación de imágenes por fluorescencia), angiografía por sustracción digital (DSA), formación de imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET) y/u otros análisis de formación de imágenes. La proliferación de células tumorales también se puede analizar mediante el uso de análisis celulares que miden, por ejemplo, la síntesis del ADN, la actividad metabólica, los antígenos asociados con la proliferación celular y/o ATP. En diversas realizaciones, el método de la presente descripción reduce el tamaño de un tumor en al menos un 5 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 % o al menos aproximadamente un 80 %).

Además de su uso como agentes anticancerosos, también se describe que las nanopartículas que generan EOR son útiles, en general, en la biología celular para reconstituir mecanismos de señalización de redox a una alta resolución temporal y espacial. Actualmente, las señales de redox se estudian en las células añadiendo reactivos en masa a las muestras. Iluminando regiones específicas de células marcadas con nanopartículas, es posible reconstituir señales de EOR localizadas dentro de células vivas (D'Autréaux y Toledano, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8:813-24 (2007)).

La presente descripción se comprenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen la preparación de nanopartículas de la presente descripción y su uso como agentes terapéuticos. Para los experimentos descritos en el presente documento, se obtuvieron el medio de cultivo celular y el tampón fosfato salino (PBS) en Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Se adquirieron placas con fondo de cubierta de vidrio en MatTek Corp. (Ashland, MA). A menos que se indique lo contrario, se obtuvieron los productos químicos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Los disolventes orgánicos se obtuvieron en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Se usó H₂O destilada y desionizada en todos los experimentos. Se presentan los datos *in vitro* como la s.d. ± promedio y en todos los casos n > 3. Los datos se evaluaron con el ensayo t de Student. Los ejemplos 2, 3 y 4 son útiles para comprender la invención.

10 Ejemplo 1

Caracterización de nanopartículas

Se prepararon nanopartículas de WO₃/Pt usando fotodeposición (Abe *et al.*, citado anteriormente) y se caracterizaron sus características físicas. Resumidamente, se suspendieron nanopartículas de WO₃ en una solución de MeOH al 30 %/ H₂O al 70 %, en donde MeOH servía como un donador de electrones de sacrificio. La suspensión se mezcló con ácido cloroplátnico para proporcionar 2,7 % de Pt y, a continuación, se alcalinizó con NaOH a un pH de aproximadamente 12. La muestra se desairó burbujeando gas de N₂ a través de la suspensión durante 20 minutos. A continuación, la muestra se agitó durante iluminación con una lámpara Hg-Xe de 200 W durante 2 horas, seguido por diálisis frente a H₂O. Se prepararon las nanopartículas usando WO₃ que tenía una estructura de cristal ortorrómbica.

20 Se observaron las nanopartículas usando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL TEM-3011 que funcionaba a 300 kV. Se dispersaron las nanopartículas en etanol (~ 2 mg/ml) y se depositó una gota de suspensión sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono. La Figura 2A muestra una microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) de nanopartículas de WO₃, que tenían un tamaño promedio de ~ 60 nm. La Figura 2B muestra un micrográfico de HR-TEM de nanopartículas de WO₃/Pt. Se podrían discernir injertos de conglomerados de Pt comparando las Figuras 2A y 2B. Cada injerto de conglomerado de Pt contenía entre 5 y 25 nanopuntas de platino. La relación de altura con respecto a base de los injertos de conglomerados de Pt era de aproximadamente 5:1. Las propiedades del hueco de banda de las nanopartículas se confirmaron usando espectroscopía de reflectancia difusa mediante el uso de un espectrofotómetro UV visible de Shimadzu UV-2400 con una unión de reflectancia difusa (ISR-2000) (datos no mostrados).

30 Se estudiaron las propiedades funcionales de las nanopartículas. Para evaluar la utilización de oxígeno durante la síntesis de radicales de hidroxilo se midió la desaparición de O₂ disuelto mediante el uso de un electrodo de Clark (medidor de Oakton modelo DO2700, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). Las muestras se colocaron en frascos de BOD Hach personalizados (Loveland, CO) para su medición. El rendimiento del instrumento se verificó usando comprimidos estándar de oxígeno cero (Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Suiza). Se usó un filtro infrarrojo de Schott. La Figura 3 ilustra la pérdida de O₂ disuelto. Solo se observaron mínimos aumentos (por ejemplo, 0,4 °C) en la temperatura de la muestra durante un control continuado de la cámara de reacción en todos los experimentos. Se midió el O₂ durante la iluminación de las nanopartículas de WO₃/Pt (0,5 mg/ml) mediante el uso de MeOH al 0,1 % como donador de electrones de sacrificio. No se observó ningún cambio en el oxígeno disuelto cuando se expuso una solución de MeOH al 0,1 % a la luz o cuando se cambió de oscuridad a luz una suspensión de nanopartículas en H₂O. Al contrario, se observó una rápida pérdida de oxígeno disuelto al inicio de la iluminación en muestras que contenían tanto nanopartículas como metanol/agua. Según disminuía con el tiempo la disponibilidad del sustrato, la reacción se ralentizó con el tiempo.

También se evaluó la producción de radicales de hidroxilo por nanopartículas de WO₃/Pt mediante del ensayo de cumarina (Ishibashi *et al.*, *Electrochem. Commun.* 2:207-210 (2000)). Se hicieron reaccionar moléculas de cumarina no fluorescentes y radicales de hidroxilo para formar la altamente fluorescente 7-hidroxycumarina, que se cuantificó mediante el uso de mediciones de fluorescencia. Resumidamente, la cumarina se disolvió a 1 mM en H₂O mediante agitación durante la noche. Se añadieron las nanopartículas de WO₃/Pt a la solución y, a continuación, se iluminaron con luz visible desde una lámpara Newport de 200 W con agitación constante. Se recogieron alícuotas y se evaluaron mediante el uso de espectrofotometría de fluorescencia con una longitud de onda de emisión de 460 nm y una longitud de onda de excitación de 332 nm. La Figura 4A muestra la cinética de la formación de 7-hidroxycumarina. Los experimentos demostraron un aumento en la fluorescencia de 7-hidroxycumarina con el tiempo y confirmaron la actividad catalítica de las nanopartículas.

55 Como ejemplo comparativo, se prepararon nanopartículas de WO₃/Pt mediante el uso de fotodeposición como se ha descrito anteriormente, pero sin ajustar el pH de la suspensión a un pH de aproximadamente 12. En su lugar, se suspendieron nanopartículas de WO₃ en una solución de MeOH al 30 %/H₂O al 70 % y la suspensión se mezcló con ácido cloroplátnico para proporcionar 2,7 % de Pt y a un pH de aproximadamente 2. La Figura 4B compara la cinética de la formación de 7-hidroxycumarina de nanopartículas de WO₃/Pt preparadas a un pH alcalino y nanopartículas de WO₃/Pt preparadas a un pH ácido. Se llevaron a cabo experimentos de formación de hidroxilo en

un vaso de reacción abierto que contenía 1mM de cumarina y 0,5 mg/ml de nanopartículas de WO₃/Pt. Se recogieron alícuotas en diversos puntos de tiempo, se centrifugaron para retirar el catalizador y, a continuación, se analizaron mediante el uso de un espectrofotómetro de fluorescencia. La cinética del aspecto de fluorescencia de 7-hidroxycumarina fue sustancialmente superior mediante el uso de nanopartículas preparadas a un pH alcalino de la descripción en comparación con las producidas a un pH 2 en condiciones, de otro modo, idénticas. Las nanopartículas de WO₃ no modificadas tuvieron niveles insignificantes de producción de radicales de hidroxilo.

En otro ejemplo comparativo, las nanopartículas de WO₃/Pt se prepararon mediante el uso de WO₃ que tenía una estructura de cristal hexagonal en lugar de una estructura de cristal ortorrómbica. Las intensidades de fluorescencia relativas de 7-hidroxycumarina después de 90 minutos de iluminación fueron 222 ± 27 unidades de fluorescencia para nanopartículas de WO₃/Pt ortorrómbicas y 140 ± 33 unidades de fluorescencia para nanopartículas de WO₃/Pt tetragonales, una diferencia estadísticamente significativa. Adicionalmente, no hubo diferencia significativa en la producción de radicales de hidroxilo para las nanopartículas de WO₃/Pt ortorrómbicas que tenían una modificación de superficie de folato, en comparación con nanopartículas de WO₃/Pt sin folato.

Se evaluó la capacidad de las nanopartículas de actuar sobre moléculas orgánicas complejas. Se emplearon métodos espectrofotométricos para caracterizar la degradación de compuestos orgánicos mediante nanopartículas de WO₃/Pt. Se usaron los tintes de naranja de metilo y azul de metileno ya que su degradación se media por huecos de banda de valencia y pueden controlarse mediante espectrofotometría. El naranja de metilo es resistente a la degradación por EOR, de modo que su destrucción está principalmente mediada por huecos de banda de valencia. Se disolvió naranja de metilo en H₂O a una concentración de 128 µM a aproximadamente pH 3, seguido por la adición de 1 mg/ml de nanopartículas de WO₃/Pt. Para asegurar la disponibilidad de oxígeno, se usó una bomba para burbujear suavemente aire en la cámara de reacción. Una lámpara Newport de 200 W proporcionaba iluminación. Se interpuso un filtro de agua entre la lámpara y la muestra para evitar el calentamiento de la muestra. Las muestras se agitaron durante su iluminación y se retiraban periódicamente alícuotas, se centrifugaron para retirar el catalizador y, a continuación, se leyeron a 465 nm para controlar la degradación del tinte. Para el ensayo de azul de metileno, se agitó una suspensión de 46,9 µM de azul de metileno y 0,5 mg/ml de nanopartículas de WO₃/Pt con aireación mientras que se iluminaban. En diversos tiempos, se recogieron alícuotas y se leyeron a 660 nm. Como se ha destacado por otros (Qourzal *et al.*, J. Photochem. Photobiol. A:Chem. 163:317-321 (2004)), la fotólisis directa de los compuestos en la ausencia de un catalizador fue pequeña. La absorción de luz por el naranja de metilo se determinó que era una función lineal de concentración en los intervalos usados. Los datos de degradación indicaron que la degradación mediada por nanopartículas del naranja de metilo fue completa a los 60 minutos. Los datos de degradación se evaluaron usando la ecuación de Langmuir-Hinshelwood: $\ln(C_0/C) = k_{app} \cdot t$, donde C₀ = concentración inicial, C = concentración en tiempo t, t = tiempo y, a concentraciones bajas de tinte k_{app} = el producto de la constante de velocidad (k_r) y la constante de equilibrio aparente de la unión de tinte-nanopartícula (K_e). Los análisis cuantitativos mediante el uso de diagramas de Langmuir-Hinshelwood fueron lineales, lo que sugería una reacción de primer orden. Se hallaron resultados similares en experimentos que utilizaban azul de metileno como sustrato.

Para determinar si las biomoléculas fueron actuadas por las nanopartículas de WO₃/Pt, se incubó glucosa con nanopartículas en presencia de oscuridad o luz. Para distinguir entre los mecanismos de daño oxidativo, se incluyó t-butanol en las mezclas de reacción a 100 mM. El t-butanol es un neutralizador excelente de radicales de hidroxilo, pero un mal neutralizador de huecos de banda de valencia (Kim *et al.*, Environ. Sci. Technol. 44:68496954 (2010)) y, de este modo, permitió entender las contribuciones de los radicales de hidroxilo y huecos de banda de valencia de las reacciones de degradación. La temperatura de la muestra se controló continuamente durante el experimento y se halló que no cambiaba significativamente. Como se ilustra en la Figura 5, la glucosa contribuyó en la utilización de O₂. La combinación de nanopartícula, sustrato y luz llevó a la desaparición de oxígeno disuelto. La adición del neutralizador de radicales de hidroxilo t-butanol, que no era un sustrato para los huecos de banda de valencia, tuvo un efecto mínimo sobre la desaparición de oxígeno. Los datos sugirieron que una fracción importante de las moléculas de glucosa reaccionaron con huecos de banda de valencia, lo que respalda que la glucosa era un sustrato para los huecos de banda de valencia.

Ejemplo 2

Absorción de nanopartículas en células tumorales

Se obtuvo la línea celular murina de cáncer de mama 4T1 (Tao *et al.*, BMC Cancer. 8:228 (2008)) de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se mantuvieron en matraces de cultivo de tejidos de plástico en medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contenía un 10 % de FBS inactivado por calor y un 1 % de antibiótico/antimicótico. Las células se incubaron de 24 a 48 horas con nanopartículas de WO₃/Pt (400 µg/ml). Después de retirar las nanopartículas libres, se sometieron a formación de imágenes las muestras con microscopía óptica. La microscopía de fluorescencia se llevó a cabo usando un objetivo Plan Fluor de 20x (NA = 0,5) o 40x (NA = 0,6) (Nikon, Melville, NY) y una cámara iXon de Andor (Andor Technology, Belfast, Irlanda del Norte) unida en el puerto inferior de un microscopio invertido TE2000-U de Nikon con una lámpara de mercurio de 100 W. Se capturaron y procesaron las imágenes con software Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, PA). Se realizaron experimentos de control mediante el uso de células cultivadas en paralelo, pero sin nanopartículas. Las

nanopartículas se acumularon dentro de células tumorales, como se ha demostrado mediante la acumulación perinuclear en la oscuridad de nanopartículas (Figura 6B), pero no en células sin tratamiento (Figura 6A).

Se llevaron a cabo estudios similares con microscopía mejorada por resonancia de plasmón de superficie. Para llevar a cabo la microscopía mejorada por resonancia de plasmón de superficie (Vainrub *et al.*, Optics Lett. 31:2855—7 (2006)), se unieron un condensador en campo oscuro (NA=1,2 - 1,4) de CytoViva, Inc. (Auburn, AL) y una fuente de iluminación a un vehículo de Zeiss para iluminación de luz transmitida. Se empleó un microscopio Axiovert de Zeiss equipado con un objetivo de campo oscuro (NA=1,6 - 1,3 NA) de 100x (Olympus). La microscopía mejorada por resonancia de plasmón de superficie produjo imágenes de alto contraste que se capturaron tal como se ha descrito anteriormente. Las células incubadas en tampón no demostraron una microscopía mejorada por resonancia de plasmón de superficie (Figura 6C). Sin embargo, las células expuestas a nanopartículas de WO₃/Pt demostraron una difusión intensa (Figura 6D) indicando, de este modo, que las nanopartículas se acumulaban dentro del citoplasma.

Para identificar el emplazamiento de las nanopartículas de WO₃/Pt dentro de las células, se llevaron a cabo estudios TEM de control y células tratadas con nanopartículas. Las muestras de células se fijaron con glutaraldehído al 2 %, se lavaron exhaustivamente y, a continuación, se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2 % (Polysciences, Warrington, PA). Las células se deshidrataron en una serie de etanol graduado y, a continuación, se incorporaron en resina de Spurr. Se cortaron finas secciones y, a continuación, se contratiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Se recogieron los micrográficos de electrones de transmisión con un TEM CM-100 de Philips. Debido a su densidad de electrones, las nanopartículas aparecieron como pequeños puntos negros en los micrográficos. La Figura 6F muestra que las nanopartículas se acumularon en compartimentos vacuolares de células tumorales. Como las membranas se podían ver en la periferia de las estructuras (Figura 6F, inserto y flecha), parecieron ser endosomas perinucleares. La Figura 6G muestra una célula tumoral tratada con nanopartículas expuesta a terapia con luz durante 2 horas. Los cambios en la morfología celular fueron aparentes, incluidas estructuras tipo vacuola con formas peculiares. El inserto en la Figura 6G muestra una vista de alta ampliación en la periferia de una vacuola y no hubo indicio de que la vacuola estuviera rodeada por una estructura de membrana; algunas nanopartículas parecieron extenderse en el citoplasma (flecha). La Figura 6H muestra una célula tumoral tratada con nanopartículas expuesta a terapia con luz durante 5 horas, lo cual dio como resultado una pérdida en la integridad celular.

Para determinar si los endosomas habían madurado en lisosomas secundarios, se incubaron células tumorales durante la noche con nanopartículas de WO₃/Pt y se marcaron con el sustrato fluorogénico Magic Red MR-(RR)2, que detectaba la actividad de la catepsina B, tal como se describe por el fabricante (Immunocytochemistry Tech., Bloomington, MN). Resumidamente, las células tumorales sobre los portaobjetos se expusieron al sustrato durante 40 minutos, se aclararon con tampón y, a continuación, se observaron mediante microscopía. Se llevó a cabo microscopía óptica sobre células tumorales marcadas con nanopartículas de WO₃/Pt y se expusieron a oscuridad o luz. Se llevó a cabo la formación de imágenes mediante el uso de luz transmitida o emisión de epifluorescencia. Los liposomas aparecieron como fluorescencia punteada mientras que la tinción citoplásmica fue difusa (Mediavilla-Varela *et al.*, Mol Cancer.8:68 (2009)). Cuando se mantuvo en la oscuridad, el emplazamiento de las nanopartículas dentro de las células fue coincidente con el marcaje de catepsina B, lo que indicó la formación de lisosomas secundarios y que muchas nanopartículas se suministraron a lisosomas secundarios. Para evaluar el efecto de la activación de nanopartículas en la estabilidad de lisosomas, las células también se expusieron a luz durante 2 h antes del marcaje de catepsina B. Después de 2 h de exposición con luz, la tinción de catepsina B punteada se redujo drásticamente, mientras que el marcaje difuso aumentó en el citosol indicando, de este modo, permeabilidad lisosomal.

Ejemplo 3

Respuesta de células tumorales marcadas con nanopartículas a la luz *in vitro*

Para confirmar que las nanopartículas de WO₃/Pt retenían actividad catalítica dentro de células vivas, la producción de radicales de hidroxilo se controló usando dihidrorodamina 6G. Se incubaron células tumorales con nanopartículas en la oscuridad, como se ha descrito anteriormente y se marcaron con dihidrorodamina 6G (Anaspec, Fremont, CA) (Qin *et al.*, Cell Biol Int. 32:224-8 (2008)) en HBSS modificado (10 mM de HEPES, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 2,7 mM de glucosa). Resumidamente, las células se incubaron con 5 µg/ml de dihidrorodamina 6G durante 10 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron exhaustivamente y se iluminaron durante 30 minutos. Las muestras se observaron mediante el uso de microscopía de fluorescencia para detectar rodamina 6G, el producto oxidado de dihidrorodamina 6G, que se había formado mediante exposición a EOR (Qin *et al.*, citado anteriormente). Para minimizar el fotoblanqueo de la sonda, se usó una sonda excitada en el rojo y el tiempo de incubación se limitó a 30 minutos (-0,6 lm/cm²). En la oscuridad, la fluorescencia de rodamina 6G fue mínima (Figura 7A). Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 7B, la iluminación de la muestra llevó a una fluorescencia sustancial, lo que demostró la formación de radicales de hidroxilo dentro de las células.

Puesto que las nanopartículas producían radicales de hidroxilo dentro de lisosomas secundarios, la membrana lisosomal, que es rica en ácidos grasos poliinsaturados, era una diana probable de estos radicales. Para su confirmación, se marcaron con Liperfluo células tumorales marcadas con nanopartículas, un reactivo que detectaba específicamente peróxidos lipídicos. Resumidamente, se produjo una solución de Liperfluo (N-(4-difenilfosfinofenil)-

N'-(3,6,9,12-tetraoxatridecil)perileno-3,4,9,10- tetracarboxidiimida) (Dojindo, Inc., Rockville, MD) mediante el uso de DMSO como disolvente (Yamanaka et al., RCS Adv. 2:7894-7900 (2012)). Se lavaron las células tumorales con HBSS modificado y se añadió Liperfluo a 20 μ M durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células se mantuvieron en la oscuridad o iluminadas durante 20 minutos. Se observaron las células mediante el uso de un conjunto de filtros de fluoresceína y se observaron después de 20 minutos en la oscuridad o luz visible. Aunque no se observó peroxidación lipídica en la oscuridad (Figura 7C), se observó conversión exhaustiva de Liperfluo después de la iluminación (Figura 7D), especialmente en la región perinuclear.

Un producto tóxico clave de la peroxidación lipídica es el 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), que reacciona con biomoléculas para bloquear las funciones celulares. Para evaluar el daño de proteínas mediado por 4-HNE, se incubaron células con o sin exposición a luz durante 2 horas y se marcaron con anticuerpos de aducto de anti-4-HNE-cisteína. Como muestra la Figura 7E, los aductos de 4-HNE no se observaron en muestras incubadas en la oscuridad, pero se observaron en células expuestas a la luz (Figura 7F). Puesto que la producción de peróxido lipídico daña las bicapas lipídicas, se sometió a ensayo la estabilidad lisosomal mediante el uso del protocolo de Lyso-ID Rojo (Enzo Life Sci., Farmingdale, NY). Resumidamente, después de la exposición a iluminación u oscuridad, las muestras se incubaron con una dilución de 1:1000 de la solución madre proporcionada por el fabricante durante 20 minutos a 37 °C, seguido de microscopía de fluorescencia. Cuando se incubó en la oscuridad, el bajo pH de los lisosomas promovió la acumulación del Lyso-ID Rojo, llevando a una fluorescencia lisosomal con fluorescencia citoplásmica mínima (Figura 7G). Sin embargo, después de su incubación con luz, la tinción lisosomal se redujo, mientras que la fluorescencia citoplásmica se potenció. Los datos indicaron que las membranas lisosomales no estaban intactas después de la iluminación. De este modo, la peroxidación lipídica mediada por EOR y la inestabilidad lisosomal consiguiente parecieron contribuir en la muerte celular.

Se midió el efecto de luz visible en la apoptosis de células tratadas con nanopartículas de WO_3/Pt mediante el uso de un ensayo de activación de caspasa. Las muestras se marcaron usando el kit inhibidor de caspasa 3/7 FAM-FLICA tal como se describe por el fabricante (Immunochemistry Tech.). Después de lavar para eliminar inhibidor no unido, las muestras se examinaron mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Las Figuras 7I y 7J muestran la activación dependiente de luz de la caspasa 3/7 en células tumorales tratadas con nanopartículas. Después de 6 h de exposición a oscuridad, no se observó activación de caspasa 3/7 (Figura 7I). Sin embargo, después de iluminación visible (51 J/cm²) la mayoría de las células mostró activación de caspasa 3/7 (Figura 7J). También se observó un cambio en las células a la forma esférica asociada con la apoptosis en células que expresaban caspasa 3 activada (datos no mostrados). Las muestras se fijaron usando paraformaldehído al 3,7 % durante la noche y, a continuación, se lavaron con PBS. Las muestras se bloquearon con Image-iT FX (Invitrogen) durante 30 minutos seguido por el kit de bloqueo de biotina endógena (Invitrogen) y se marcaron durante 1 h con un anticuerpo de caspasa 3 activada (Bioss, Woburn, MA). Después de aclararse con PBS, las muestras se incubaron durante 1 h con anti-IgG de conejo de cabra conjugado con biotina XX (Invitrogen). Las células se lavaron después de un tratamiento de 30 minutos con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 594 (Invitrogen). Después del tratamiento con estreptavidina, las células se lavaron y se sometieron a formación de imágenes. También se verificó la apoptosis mediante el uso de un anticuerpo dirigido frente a un epítipo de activación de la caspasa 3. Para la visualización de los aductos de Michael, las muestras se fijaron durante 15 minutos en DSP, se extrajeron durante 2 minutos con 100 % de etanol, a continuación, se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 20 minutos. A continuación, las muestras se bloquearon con BSA al 3 % durante 1 hora seguido por 30 minutos con Image-IT FX (Invitrogen). Las muestras se marcaron usando un anticuerpo de aductos de Michael de 4-HNE (EMD Millipore, San Diego, CA). El marcaje de la segunda etapa se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Se observó un aumento drástico en la activación de caspasa 3.

Se usó el método citoquímico de hidrazida de ácido 3-hidroxi-2-naftoico (NAH) para someter a ensayo la reactividad aldehído en las muestras de células. Los aldehídos, un producto de peroxidación lipídica, se detectaron usando la reacción de hidrazida de ácido 2-OH-3-naftoico (Pompella y Comporti, Am J Pathol. 142:1353-7 (1993)). Resumidamente, las células se fijaron con ácido tricloroacético al 5 % durante 1 minuto, a continuación, se lavaron 4 veces con solución salina durante 5 minutos cada una. Las muestras fijadas se expusieron a la solución de tinción (solución de NAH al 0,1 % en etanol al 50 % que contenía ácido acético al 5 %) durante 1 h a 60 °C. Las muestras se lavaron, a continuación, con etanol al 50 %. Se visualizó el producto de reacción fluorescente mediante el uso de un conjunto de filtros ópticos que comprende un filtro de excitación de 450DF65nm, un reflector dicroico de FITC, y un filtro de emisión 510ALP de paso largo. La Figura 8 muestra células tumorales marcadas con nanopartículas y sin marcar incubadas en la oscuridad o con luz durante 3 horas seguido por tinción con NAH. Los conglomerados oscuros indicaban regiones de nanopartículas acumuladas. Todas las regiones de las células mostraron sitios reactivos de aldehído, un indicador de daño oxidativo. Las regiones que contenían nanopartículas mostraron la intensidad de fluorescencia más alta. En la presencia de nanopartículas, la exposición a luz aumentó drásticamente la tinción de NAH (Figura 8B) indicando, de este modo, la formación de grupos reactivos de aldehído.

Se obtuvieron hallazgos similares mediante el uso de la sonda reactiva de aldehído O-(biotinilcarbazoilmetil)hidroxilamina seguido por marcaje con FITC-avidina. Se detectaron los sitios de aldehído dentro de células mediante el uso del Kit de Detección de Sitio de Aldehído (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se incubaron células (4T1) con o sin nanopartículas seguido por exposición a oscuridad o luz. Las células se expusieron, a continuación, a fijación, se hicieron reaccionar con ARP y se marcaron con FITC-avidina, tal como se describe por el fabricante. Se usó O-(biotinilcarbazoilmetil) hidroxilamina para marcar aldehídos y se usó FITC-

avidina para visualizar los sitios. Todas las regiones de las células tratadas con nanopartículas expuestas a luz mostraron sitios reactivos de aldehído, un indicador de daño oxidativo. Como se esperaba, las regiones que contenían nanopartículas mostraron la intensidad de fluorescencia más alta. Las células tratadas con nanopartículas expuestas a oscuridad solo o las células que no se incubaron con nanopartículas no mostraron fluorescencia. Los datos indicaron una trayectoria en la que la producción de radicales de hidroxilo activaba las trayectorias de peroxidación lipídica y el daño celular oxidativo en células tratadas con nanopartículas se activaba con luz.

Ejemplo 4

Actividad *in vivo* de nanopartículas

Se sometió a ensayo la capacidad de nanopartículas de WO₃/Pt de influir en las células tumorales en un modelo de metástasis de cáncer de mama en la cámara anterior del ojo (McKenna y Kapp, J. Immunol. 177:1599-608 (2006) y Niederkorn, J.Y., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 25:1080-6 (1984)). El día anterior a las inyecciones oculares, se mezclaron 2,5 x 10⁶ células 4T1 con 1 mg de nanopartículas de WO₃/Pt y, a continuación, se colocaron sobre placas durante la noche en una placa de 60 mm. Al siguiente día, las células marcadas con nanopartículas se retiraron de la placa y se lavaron con medio y PBS para retirar nanopartículas no unidas. Las células se resuspendieron en 250 µl de PBS a una concentración final de 10⁴ células por µl. Tras la administración de anestesia, se realizó una incisión en la córnea izquierda cerca del borde dorsal y, a continuación, mediante el uso de una aguja de calibre 29, se dejó escapar algo de fluido intraocular. Mediante el uso de una jeringa Hamilton de 2 µl con una aguja de punta roma, 1 µl de las células (10⁴ células) se inyectaron a través de la incisión. Ambos ojos se cubrieron con ungüento oftálmico para evitar su secado. Cada ratón se colocó en una jaula separada hasta que su completa recuperación ambulatoria y, a continuación, se devolvió a una jaula de alojamiento estándar.

Los ojos sin tratamiento y los ojos tratados con nanopartículas solo no mostraron tumores. Hubo un crecimiento tumoral significativo en animales tratados con 4T1, que sobrevivieron de 14 a 16 días (Figura 9). En algunos experimentos, los ratones tratados con células 4T1 y nanopartículas de WO₃/Pt se mantuvieron en oscuridad constante y los ratones mostraron tumores grandes que eran indistinguibles de los controles positivos. Los ratones tratados con nanopartículas de WO₃ que carecían de Pt también mostraron grandes tumores al día 16 (Figura 9C). La histoquímica posterior confirmó la presencia de células tumorales en los animales. Se fijó tejido en paraformaldehído tamponado al 4 %, se incorporó en parafina y se cortó en secciones de un grosor de 5 µm. Las secciones se tiñeron con hemaóxilina/eosina y se visualizaron con microscopía de luz transmitida. Al contrario, los animales tratados con nanopartículas expuestos a luz ambiente demostraron cargas tumorales pequeñas a las 2 semanas (Figura 10B).

Se evaluó la supervivencia animal después del tratamiento con PDT. Se llevó a cabo terapia con luz usando un conjunto de lámparas LED. Resumidamente, se montaron tres LED de Luxeon Star Rebel (6370 mW a 700 mA) de color azul real (447 nm) (Quadica Developments, Inc., Brantford, Ontario) en una caja de plexiglás ventilada mediante el uso de disipadores térmicos y difusores ópticos sobre cada LED. Se montaron los LED para proporcionar un área de iluminación aproximadamente uniforme y superpuesta. Se montó un ventilador sobre el aparato para retirar el calor. Se construyó un suministro/temporizador de energía ajustable para accionar el ventilador y los LED. Se empleó una iluminancia de 0,6 lm/cm², que era pequeña en comparación con la exposición de luz diurna, para tratar los animales; los tiempos de exposición fueron de 30 minutos el día de la inyección y de 45 minutos dos veces a la semana posteriormente. Las curvas de supervivencia murina se evaluaron mediante el uso del análisis de Kaplan-Meier (KMWin) (Gross *et al.*, PLoS One.7:e38960 (2012)). Todos los hallazgos relativos a ratones experimentales y de control se incluyeron en los datos presentados. La Figura 10C muestra una sección de un ojo tratado con células tumorales solo. El crecimiento tumoral en la cámara anterior se indicó con una "T" y se observó la infiltración exhaustiva de estructuras colindantes. La Figura 11 muestra las curvas de supervivencia de ratones tratados con luz y de control que soportaban células tumorales marcadas con nanopartículas (90 minutos de PDT/wk.) (P < 0,0001). No hubo diferencia entre los ratones expuestos a células tumorales marcadas con nanopartículas mantenidos en la oscuridad y ratones que portaban tumores sin tratamiento (P=0,6) (Figura 12). Cuando se trataron las cámaras anteriores de ojos de Balb/b con 8 µg de nanopartículas, que igualaba la cantidad usada en los experimentos con 4T1, no se observó ningún cambio en la supervivencia animal (Figura 11). De este modo, las nanopartículas, en estas condiciones, no fueron inherentemente tóxicas para los ratones, aunque podrían reducir significativamente la carga tumoral cuando se activan.

Los Ejemplos anteriores han demostrado que las nanopartículas de WO₃/Pt de acuerdo con la presente descripción combinadas con luz visible potenciaban la destrucción de células tumorales. Las nanopartículas de WO₃/Pt, que producían EOR y degradaban compuestos orgánicos, mediaban la muerte de células tumorales *in vitro* y reducían el crecimiento tumoral *in vivo*. El suministro de nanopartículas en los lisosomas secundarios de células tumorales permitió la producción de radicales de hidroxilo, la peroxidación lipídica y la activación de la trayectoria de permeabilización de la membrana lisosomal de muerte celular (Boya y Kroemer, Oncogene. 27:6434-51 (2008)). Basándose en experimentos que medían la desaparición de oxígeno disuelto, el número de conversiones de una nanopartícula de WO₃/Pt (2500 s⁻¹) fue aproximadamente 20 veces superior a la de la oxidasa de NADPH activada (120-150 s⁻¹) de leucocitos (Cross *et al.*, Biochem. J. 338 (Pt 1):229-33 (1999)). Sin embargo, esta actividad de oxidasa de NADPH se sobreestimó puesto que la respuesta de leucocitos fue transitoria y se mitigó por el pH extracelular reducido dentro de los tumores (Gerweck y Seetharaman, Cancer Res. 56:1194-8 (1996) y Araki *et al.*,

5 Cancer Res. 51:3212-6 (1991)). Los números de conversiones de nanopartículas de WO₃/Pt para azul de metileno y naranja de metilo fueron superiores que algunas enzimas de proteínas degradativas (por ejemplo, de 1,4 a 3000 veces superiores a β-galactosidasa, quimotripsina, pepsina y ribonucleasa). Para ilustrar el impacto bioquímico de las nanopartículas, un endosoma con un diámetro de 0,2 μm iluminado que contiene 50 nanopartículas, en ausencia de otras reacciones y difusión transmembrana, acumularía radicales de hidroxilo a una concentración local de 10 M en una hora. De este modo, las actividades funcionales de las nanopartículas se comparaban favorablemente con enzimas biológicas.

10 La inducción de mecanismos de muerte celular por las nanopartículas de la presente descripción proporciona medios novedosos de gestionar distintos tipos de cáncer, incluidos cáncer ocular y de piel. Las nanopartículas que comprenden un óxido de metal y un conglomerado de platino que tienen una relación de altura con respecto a base superior a 1, de un modo dependiente de la luz, reducen el crecimiento tumoral en un modelo de metástasis de cáncer de mama de fase tardía. Los estudios con animales indican que, en presencia de luz, las nanopartículas reducen la carga tumoral. La supervivencia se ve significativamente potenciada mediante el uso de células tumorales marcadas con nanopartículas en presencia de iluminación en comparación con animales sin tratamiento o animales mantenidos en la oscuridad. La prolongación del tiempo de supervivencia de ratones tratados con nanopartículas es comparable a la prolongación de vida de ratones Balb/c que portan 4T1 en un modelo que somete a ensayo el tratamiento simultáneo con múltiples agentes quimioterapéuticos (Bao *et al.*, Am. J. Pathol. 178:838-52 (2011)). Puesto que las nanopartículas pueden activarse con luz visible para producir radicales de hidroxilo dentro de células tumorales, estimular la peroxidación lipídica, promover la permeabilización de la membrana lisosomal y activar la apoptosis, proporcionan una opción terapéutica mejorada para tratar el cáncer.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un óxido de metal, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en óxido de tungsteno, trióxido de tungsteno, óxido de titanio, óxido de zinc, óxido de cerio, óxido de hierro y combinaciones de los mismos y un conglomerado de platino injertado en el óxido de metal, que comprende
- 5 opcionalmente óxido de platino, en donde el conglomerado de platino tiene una relación de altura con respecto a base superior a 1, opcionalmente en un intervalo de 2,5 a 5, en donde la nanopartícula es una partícula que tiene al menos una dimensión que es superior a 10 nm e inferior a 500 nm, y en donde el conglomerado de platino es un agregado de átomos de platino que comprende entre 1 y 100 nanopuntas de platino y en donde la relación de altura con respecto a base es la relación axial entre la altura y la base del conglomerado de platino.
- 10 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en donde el conglomerado de platino: (a) tiene una estructura de cristal que no es cúbica; y (b) tiene una relación de superficie con respecto a volumen del conglomerado de platino superior a 1 mm¹.
3. La nanopartícula de la reivindicación 1 o 2, en donde el óxido de metal es trióxido de tungsteno y tiene una estructura de cristal ortorrómbica.
- 15 4. La nanopartícula de la reivindicación 1 o 2, en donde el óxido de metal es óxido de titanio.
5. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el diámetro de la nanopartícula es superior a 20 nm, opcionalmente de 50 nm a 60 nm.
6. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un resto de direccionamiento, opcionalmente folato o un anticuerpo anti-molécula de adhesión de células epiteliales y/o un recubrimiento biocompatible, opcionalmente seleccionado de poli-L-lisina, polietilenglicol y combinaciones de los
- 20 mismos.
7. Una composición que comprende la nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Un método de producción de nanopartículas que comprende la formación de una mezcla de nanopartículas de óxido de metal y ácido cloroplátnico y la alcalinización de la mezcla a un pH por encima de 10, opcionalmente, un
- 25 pH de 12.
9. Un método de generación de radicales de hidroxilo, que comprende irradiar la nanopartícula o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con radiación que tiene una longitud de onda superior a 400 nm.
10. La nanopartícula o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de
- 30 cáncer, seleccionada opcionalmente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer ocular, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer esofágico y cáncer pulmonar.
11. La nanopartícula o composición para su uso de la reivindicación 10, que comprende irradiar la nanopartícula con radiación que tiene una longitud de onda en un intervalo de 400 nm a 750 nm o en un intervalo de 750 nm a 1 mm.
12. La nanopartícula o composición para su uso de la reivindicación 10 u 11, en donde la nanopartícula o
- 35 composición se administra por vía intratumoral, intravenosa, intraocular, tópica o subcutánea.
13. La nanopartícula o composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 10-12 en donde la nanopartícula comprende trióxido de tungsteno.

Figura 1A

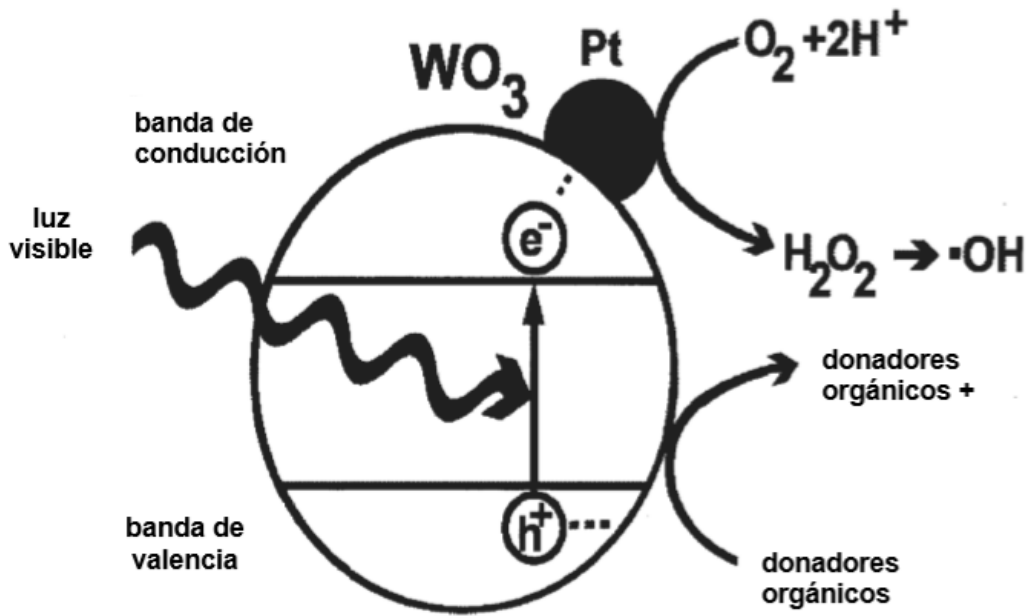


Figura 1B

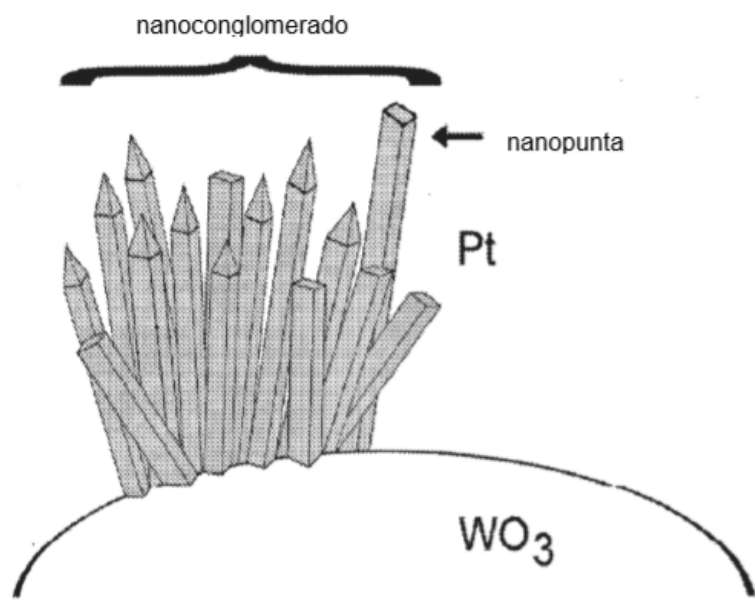


Figura 2A

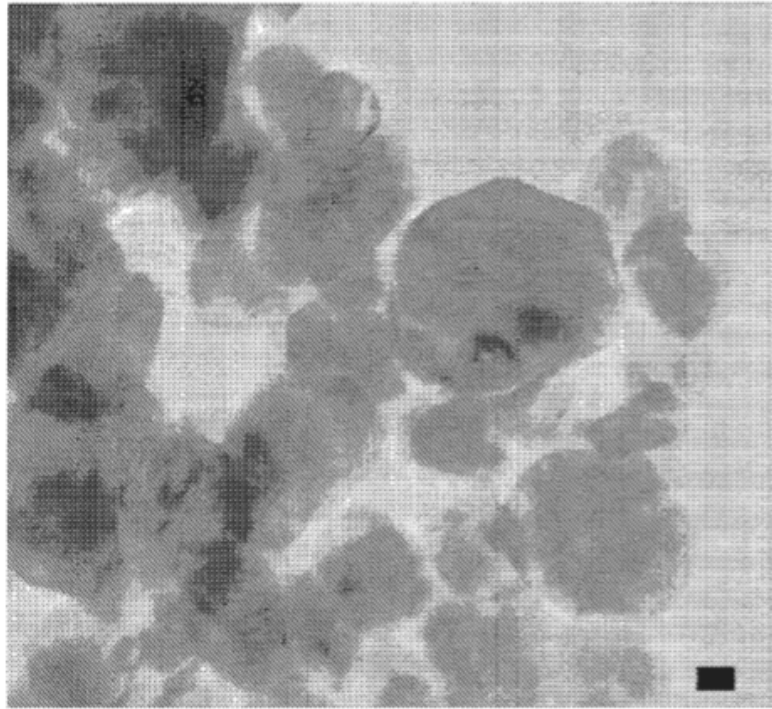


Figura 2B

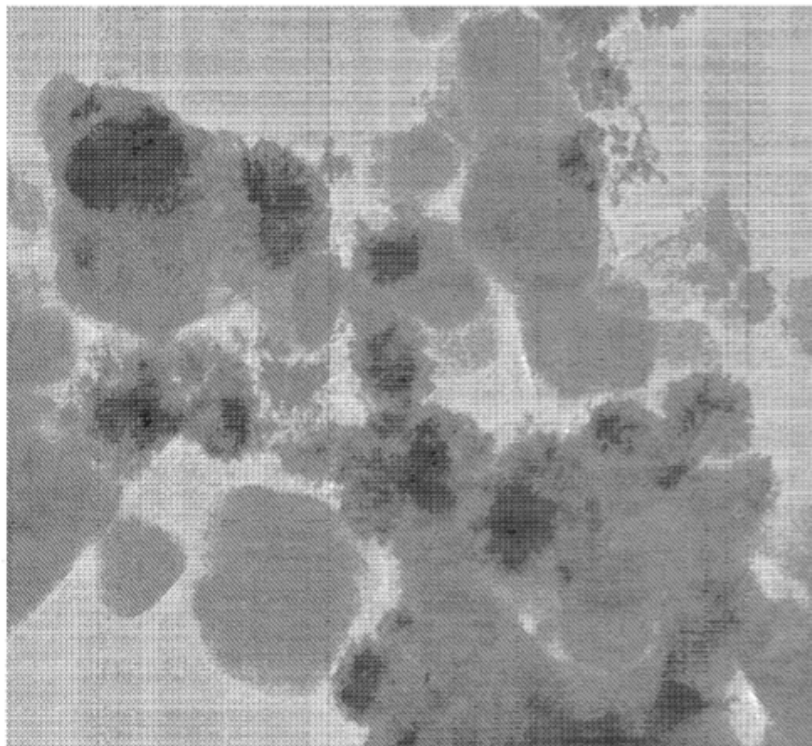


FIGURA 3

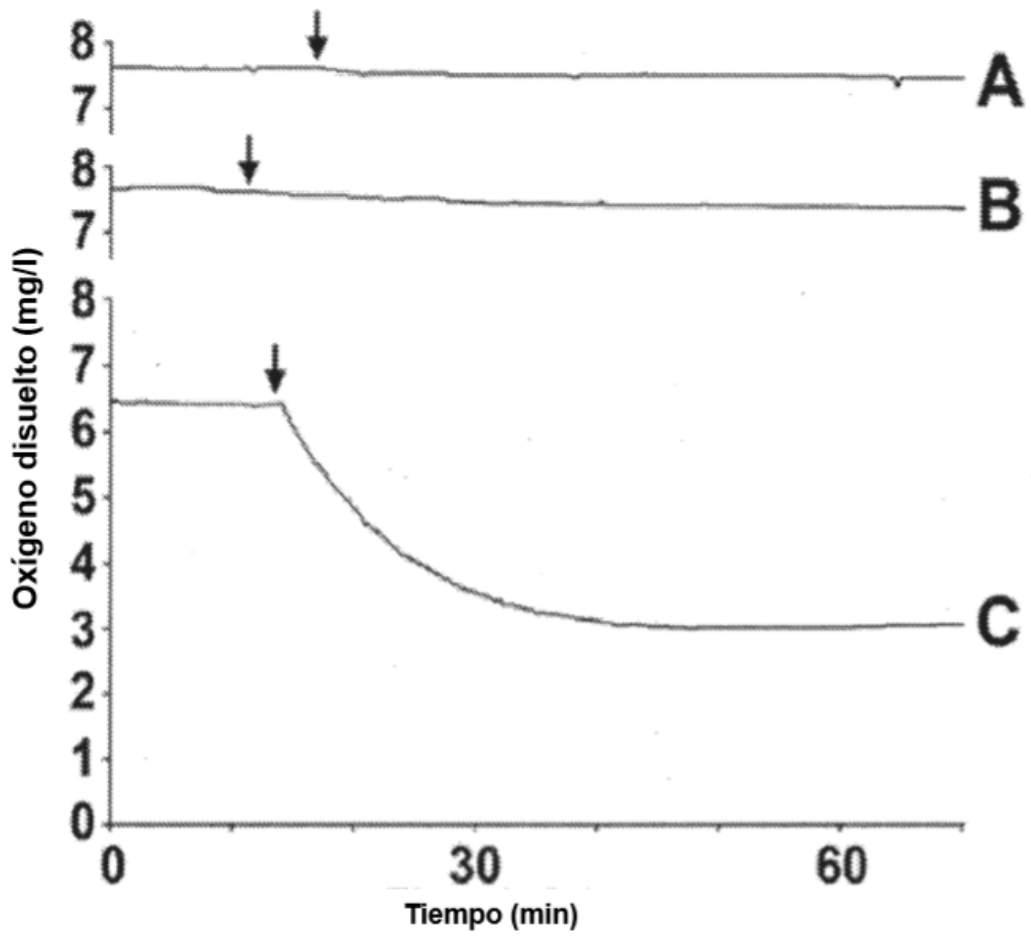


FIGURA 4A

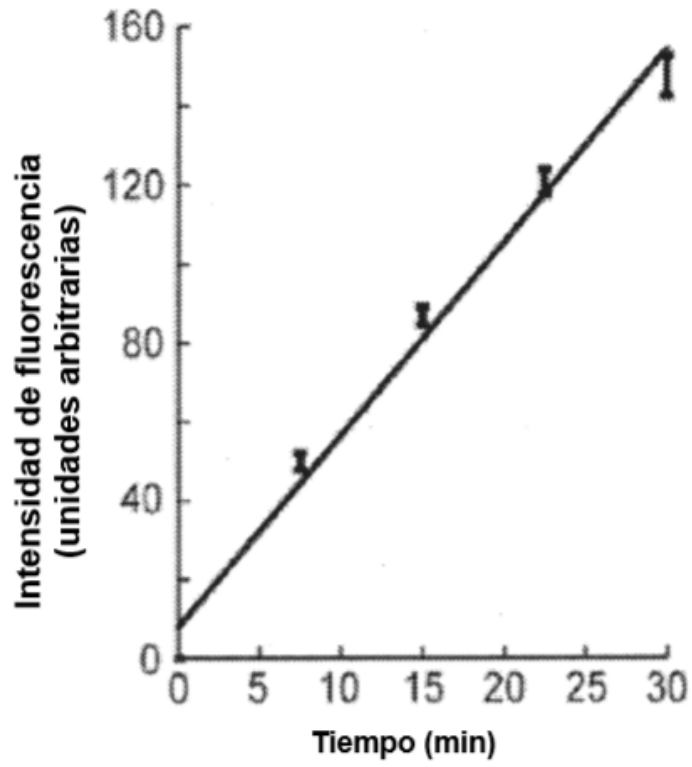


FIGURA 4B

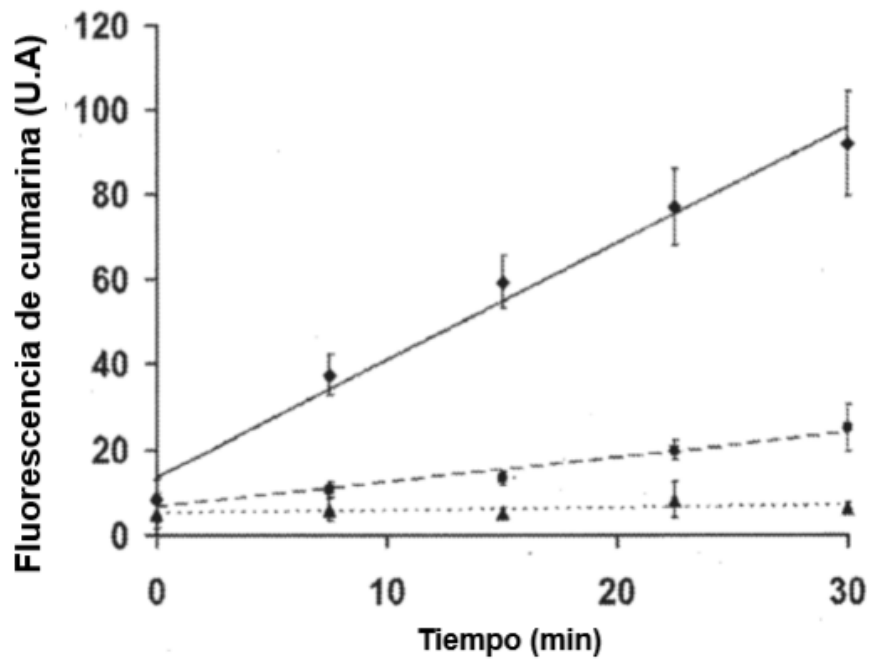


FIGURA 5

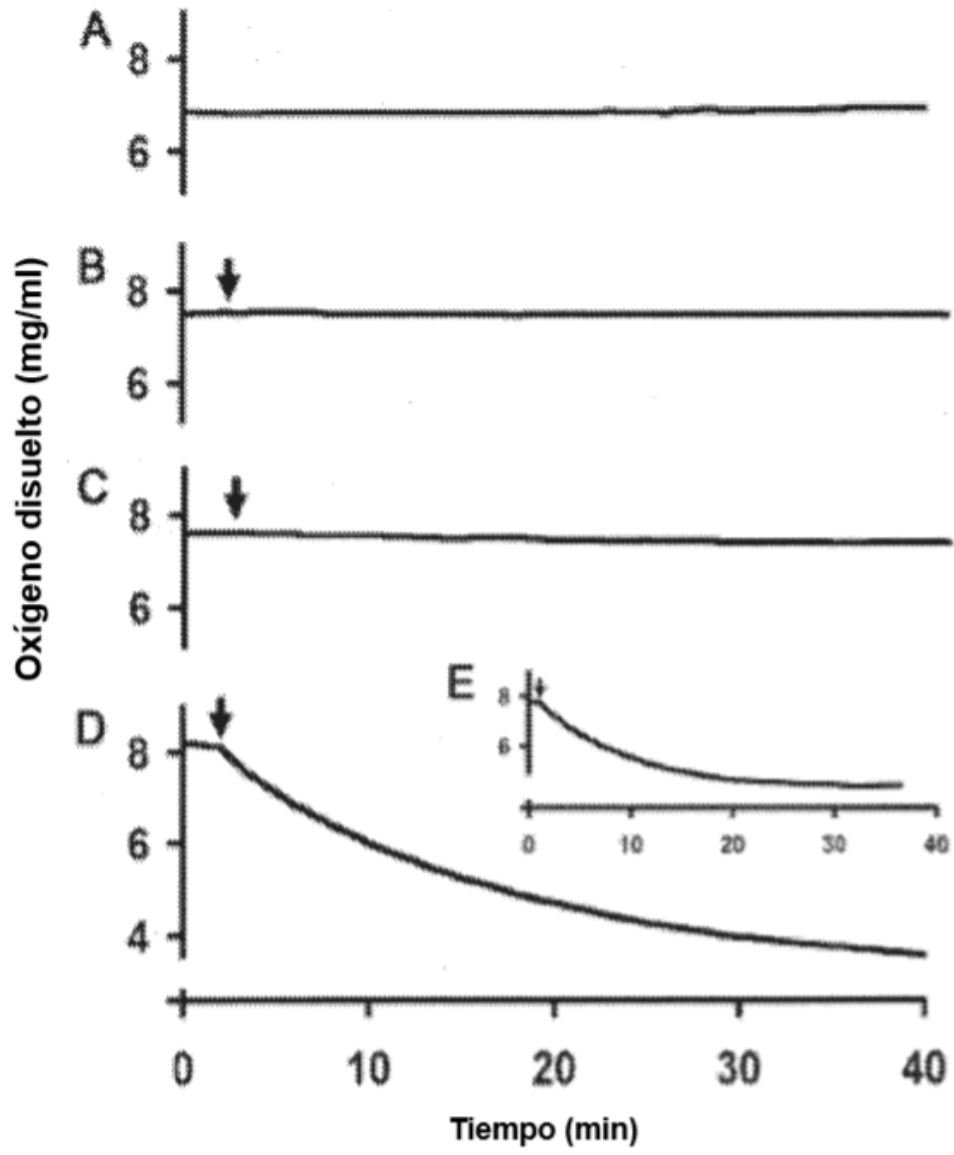


FIGURA 6

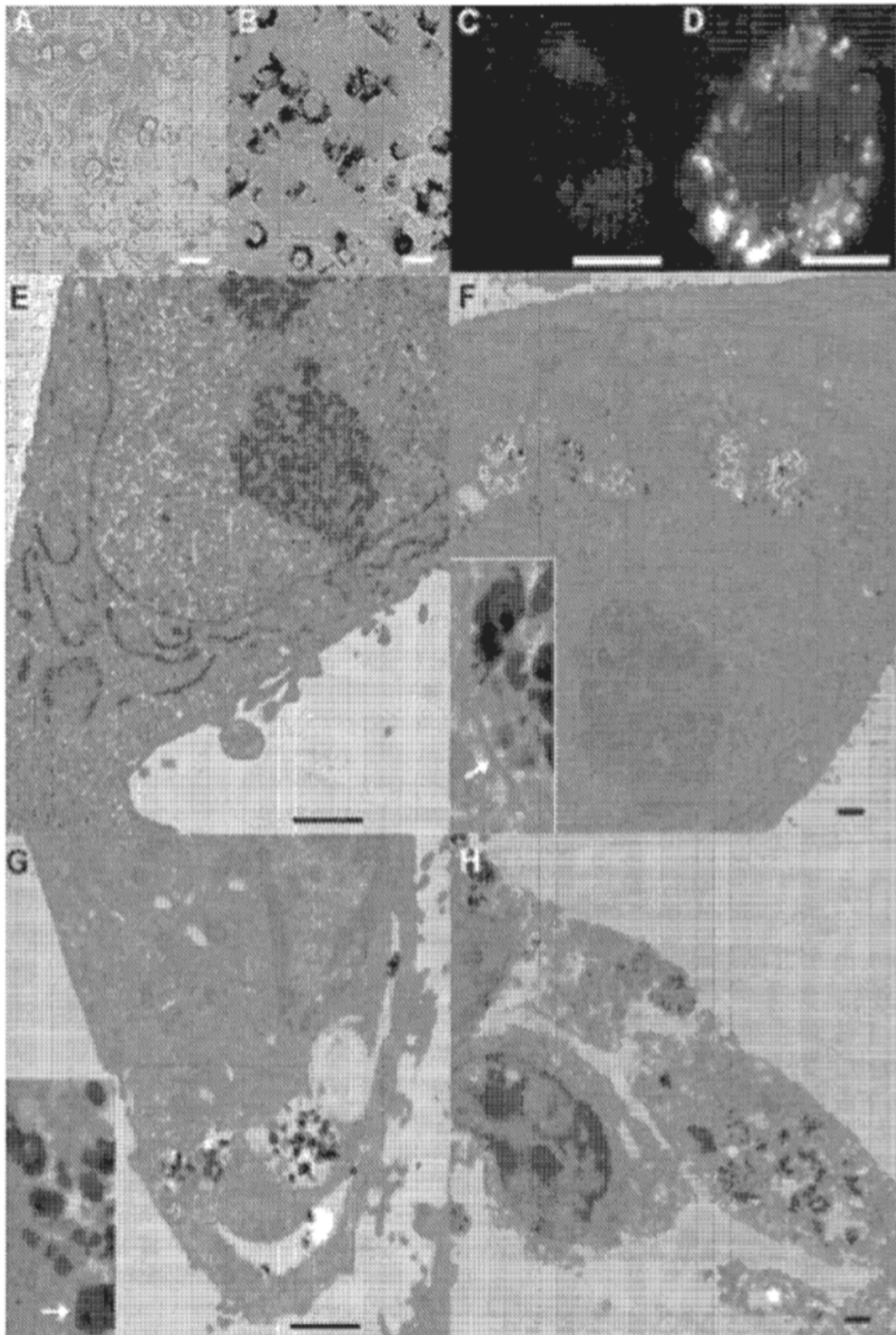


FIGURA 7

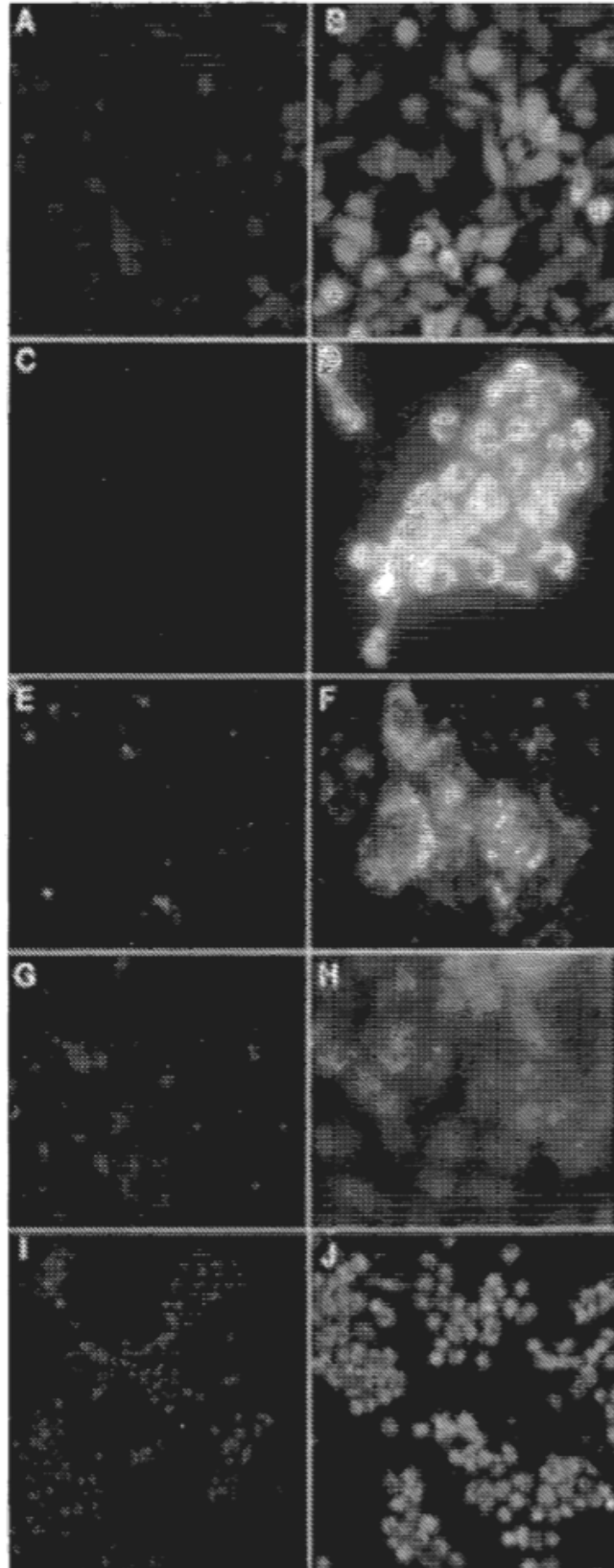


FIGURA 8

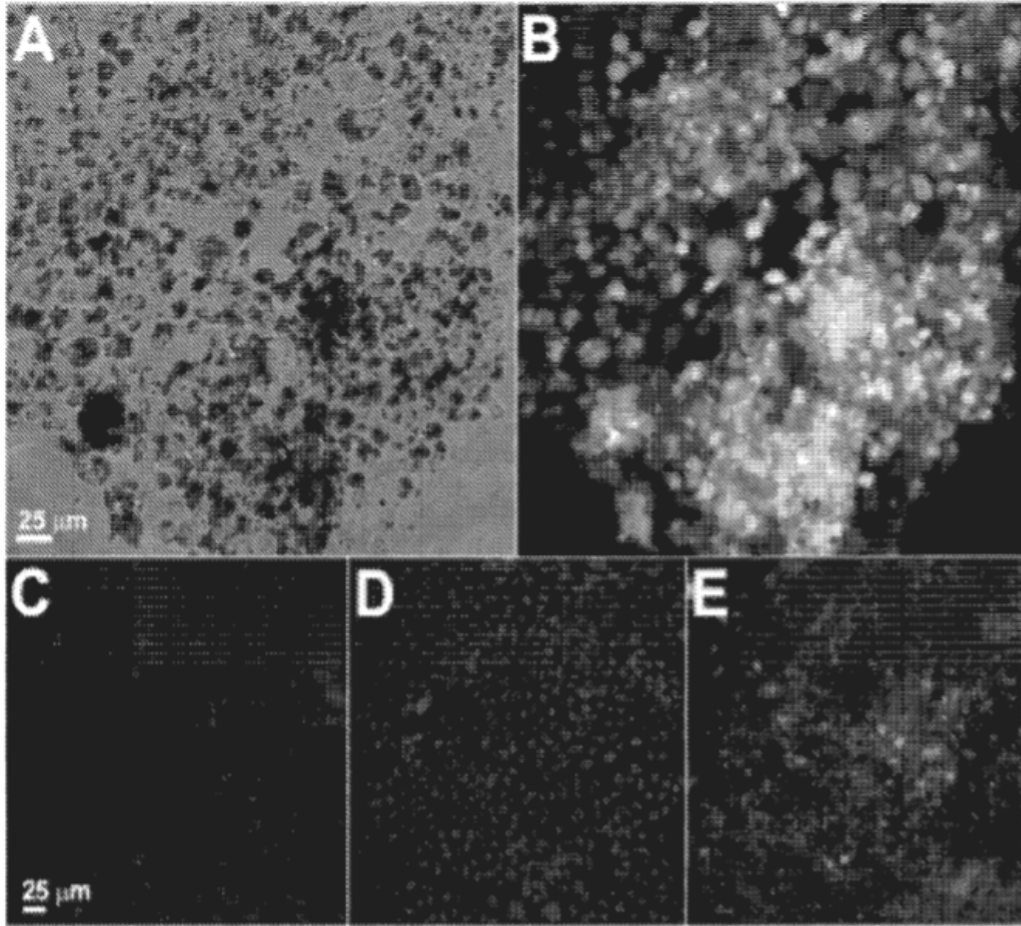


FIGURA 9

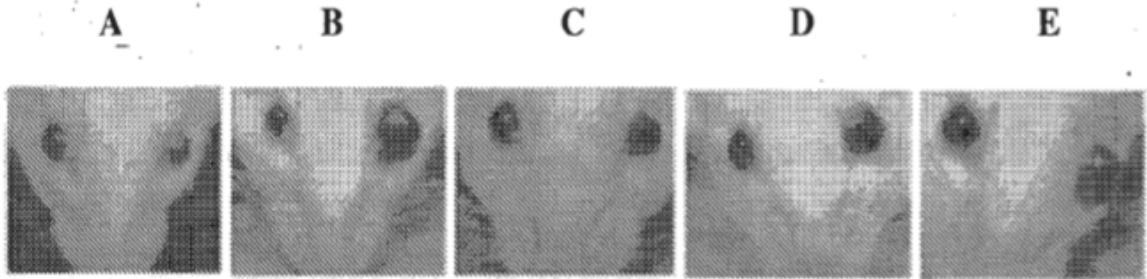
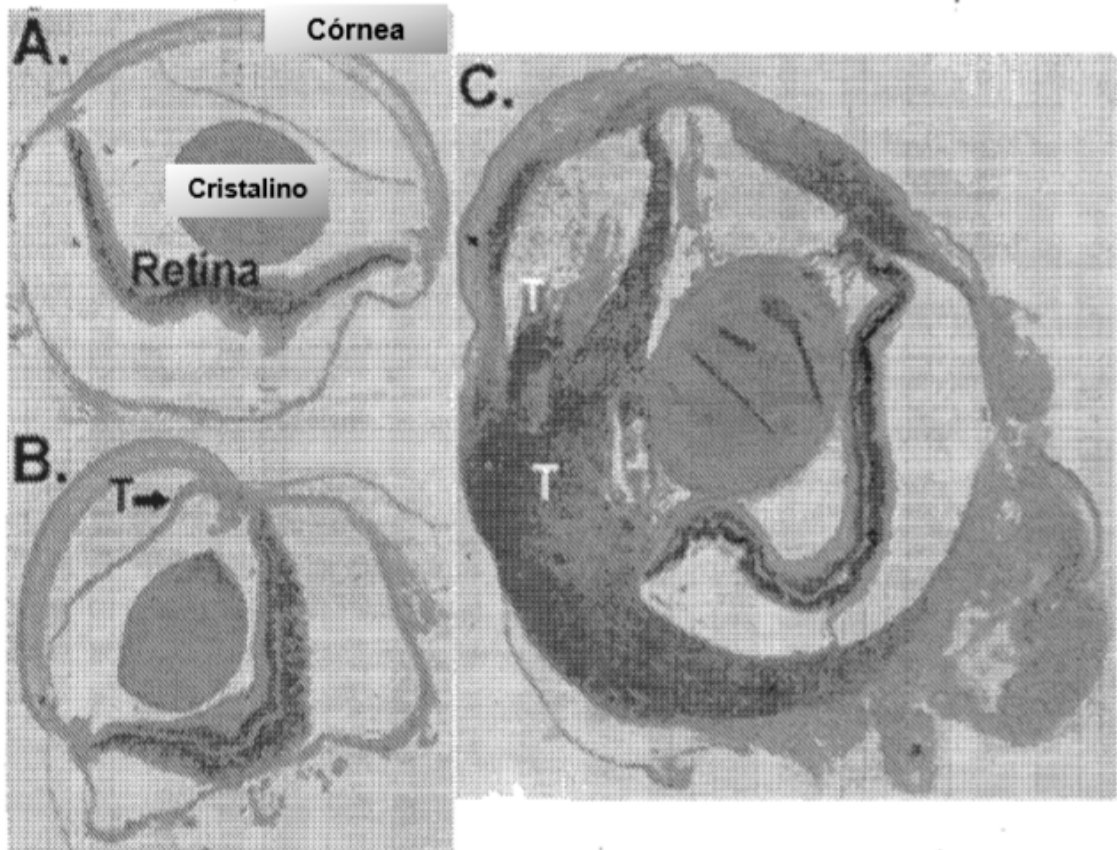


FIGURA 10



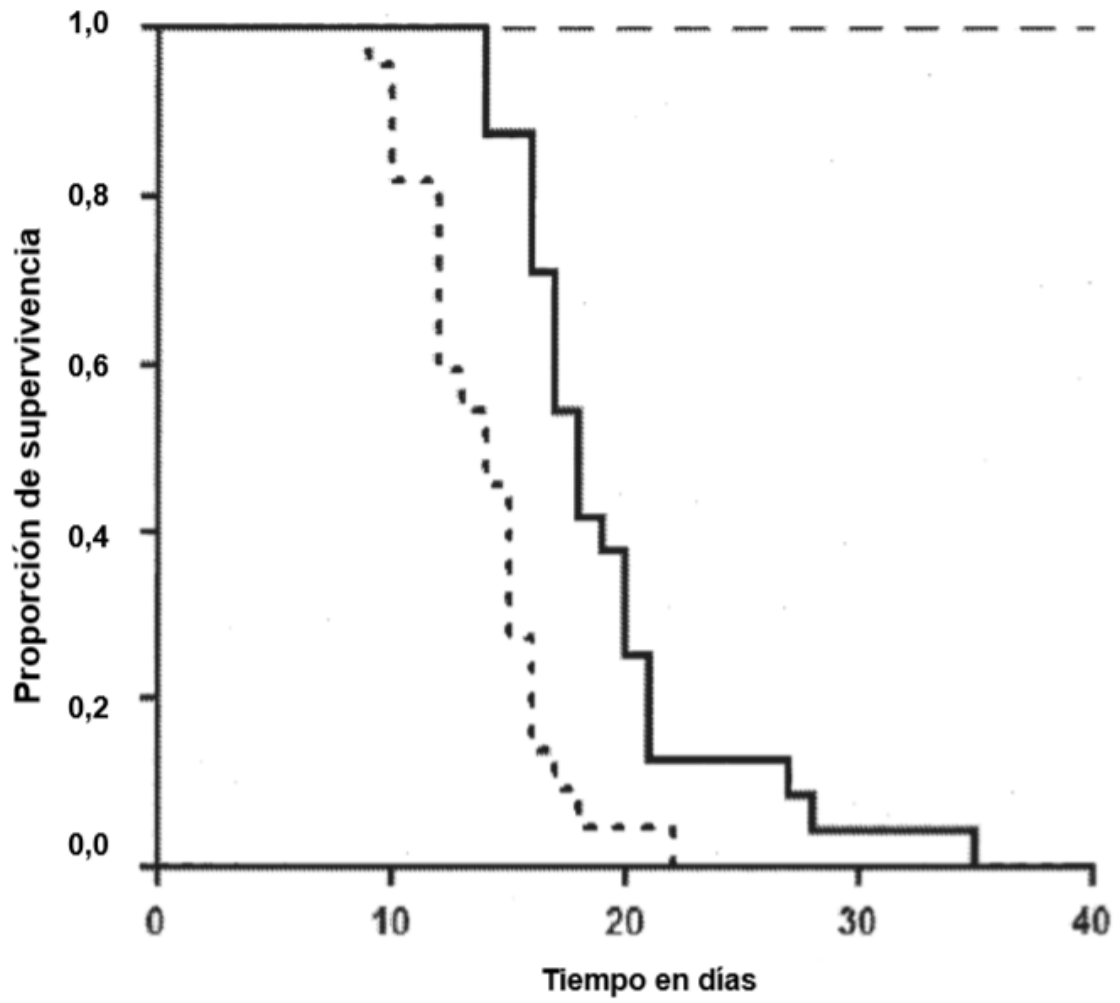


FIGURA 11

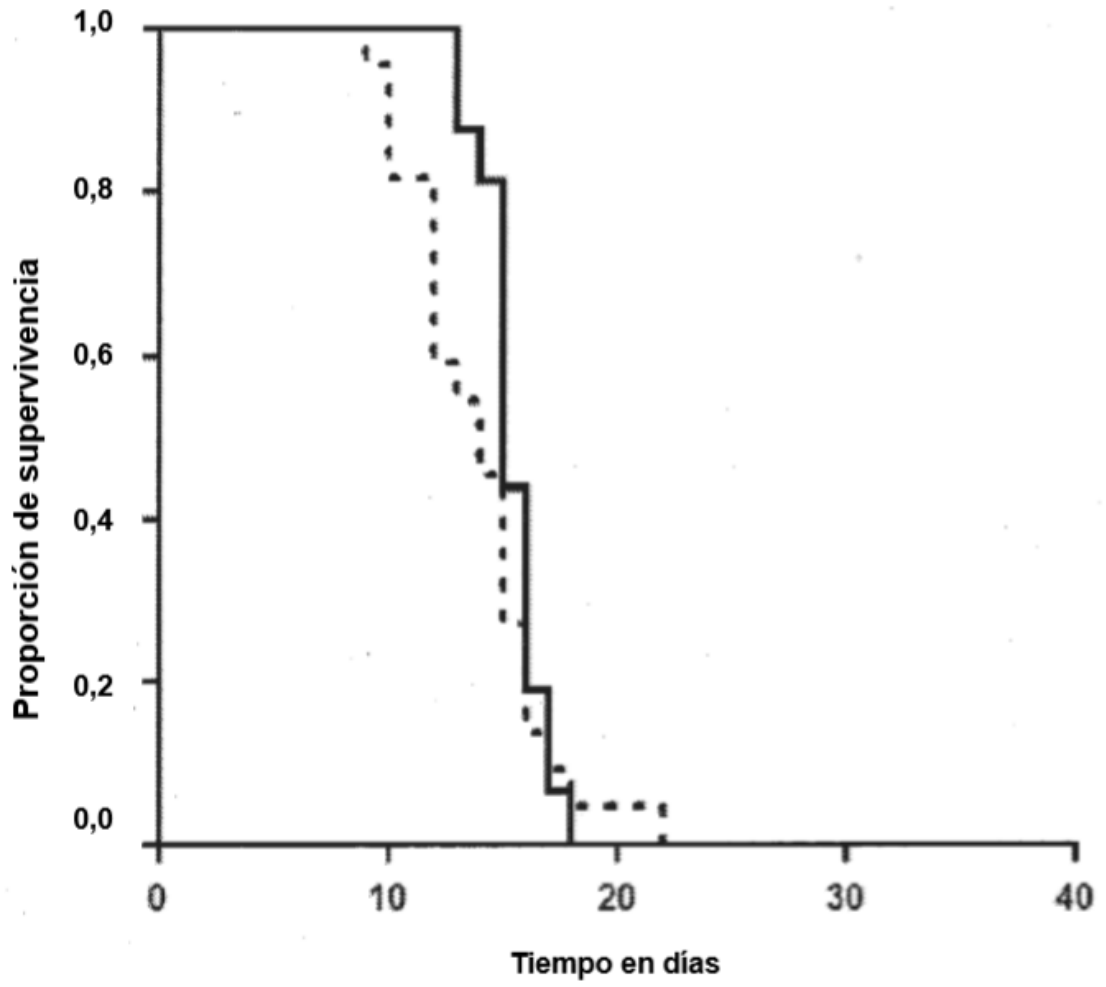


FIGURA 12