

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 950**

51 Int. Cl.:

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/02 (2006.01)

A61L 24/06 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/GB2016/051059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166550**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16719116 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3283134**

54 Título: **Partícula de embolización**

30 Prioridad:

15.04.2015 GB 201506381

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2020

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LTD.
(100.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way
Oxford, Oxfordshire OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**TOWNLEY, HELEN ELIZABETH y
BUSH, RACHEL ANNE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 742 950 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

Partícula de embolización

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una partícula de embolización y a composiciones que comprenden una pluralidad de partículas de embolización. También se describe el uso de partículas de embolización en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones para el tratamiento de cáncer, como es el uso de las partículas para embolización. La invención también proporciona un método de producción de una partícula de embolización.

Antecedentes de la invención

Se pueden usar varias técnicas diferentes en la gestión y el tratamiento de cánceres. Estas incluyen métodos quimioterapéuticos, métodos radioterapéuticos, terapia fotodinámica, métodos quirúrgicos, terapia hormonal y embolización.

La embolización es un procedimiento no quirúrgico, mínimamente invasivo, en el que vasos sanguíneos se ocluyen selectivamente introduciendo émbolos. Esta técnica se puede usar para tratar varias afecciones diferentes tales como aneurismas, fibroides uterinos y cáncer (Abramowitz S. D. et al., *Radiology*, 2009; 250(2): 482-487). En los tratamientos para el cáncer, se pueden introducir partículas embólicas en la corriente sanguínea próxima a la diana y alojarse en los pequeños vasos que alimentan el tumor restringiendo la circulación sanguínea. Como resultado, se reducen los suministros de oxígeno y nutrientes al tumor que provoca necrosis tumoral.

También son eficaces métodos radioterapéuticos y terapia fotodinámica en la reducción del tamaño tumoral. Se usa comúnmente terapia fotodinámica (PDT) para tratar algunos tipos de cáncer. La PDT implica inyectar un agente fotosensibilizante en la circulación sanguínea de un paciente. El agente es absorbido por células en todo el cuerpo, pero generalmente se acumula en el tumor debido a anomalías o defectos en la vasculatura tumoral. También es rápidamente absorbido por células cancerosas, que tienden a crecer y dividirse mucho más rápidamente que las células sanas y, por tanto, tienen una mayor actividad metabólica.

Aproximadamente 24 a 72 horas después de la inyección, cuando la mayoría del agente ha abandonado las células normales, pero sigue en el tumor, solo el tumor se expone a luz de una frecuencia específica, tal como luz UV o luz de láser. El agente fotosensibilizante que se ha acumulado en el tumor se excita por exposición a esta luz y reacciona con el oxígeno cercano o moléculas de agua en el tejido para producir especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como oxígeno singlete (vida media de 3,7 ms y una distancia de difusión de 82 nm), un radical superóxido (vida media de 50 ms y una distancia de difusión de 320 nm) o un radical hidroxilo (vida media de 10^{-7} s y una distancia de difusión de 4,5 nm). Las ROS producidas superan la capacidad de defensa del antioxidante de células cercanas, dando así como resultado la destrucción de células cancerosas en el tumor. Las cortas vidas y las distancias de difusión de las ROS permiten que las células cancerosas sean destruidas siendo causado poco o ningún daño a las células sanas vecinas. Además de destruir directamente las células cancerosas, la PDT también parece encoger o destruir los tumores dañando los vasos sanguíneos en el tumor, privándolos así de nutrientes. Un beneficio adicional es que PDT también puede activar el sistema inmunitario del paciente para atacar las células tumorales.

Se conoce que el dióxido de titanio genera ROS tras la exposición a luz UV y se ha investigado el efecto del dióxido de titanio sobre células de adenocarcinoma humano cultivadas después de irradiación UV (Xu et al., *Supramolecular Science*, 5 (1998), 449-451). En este estudio, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró alteración de la membrana celular y el sistema de endomembrana de las células como resultado de estrés oxidativo. Se cree que las partículas de dióxido de titanio producen radicales hidroxilo que oxidan los lípidos de membrana de las células para producir peroxidantes, que entonces establecen una serie de reacciones en cadena de peroxidantes. Las células malignas oxidativamente estresadas evolucionan a un estado necrótico que da como resultado su destrucción.

El dióxido de titanio y muchos de los agentes fotosensibilizantes usados en PDT son excitados por luz de una longitud de onda específica que no puede penetrar profunda en un cuerpo humano. Por consiguiente, la PDT se ha limitado al tratamiento de cánceres superficiales, tales como cánceres de piel.

Los cánceres en otras localizaciones del cuerpo se pueden tratar mejor usando radioterapia, que implica el uso de radiación ionizante, tal como rayos X o radiación por haces de protones. Sin embargo, algunos tipos de cáncer, tales como cáncer de células renales, son radiorresistentes debido a que las dosis de radiación requeridas para destruir el cáncer son demasiado altas para ser seguras en la práctica clínica. Las dosis de radiación más altas también están asociadas con un riesgo elevado de causar cáncer.

El documento de patente US 2013/323306 A1 desvela micropartículas de embolización.

El documento de patente WO 2011/070324 describe nanopartículas de óxido metálico dopadas con elementos de las tierras raras. Se ha mostrado que estas partículas son eficaces en causar muerte celular tras la exposición a radiación de rayos X.

Morrison et al., Pharm Res (2014) 31:2904-2917, describen micropartículas recubiertas con nanopartículas que comprenden agentes quimioterapéuticos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva forma de tratamiento para los cánceres.

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que se pueden producir partículas de embolización multimodales que combinan eficacia de embolización con eficacia radioterapéutica. Esto ofrece una nueva técnica para tratar cáncer embolizando simultáneamente la vasculatura tumoral tratando radioterapéuticamente el tumor. También se ha encontrado sorprendentemente que la partícula de embolización de la invención comprende nanopartículas que son radioterapéuticamente eficaces incluso en condiciones hipóxicas.

Así, la invención proporciona una partícula de embolización que comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio.

La invención proporciona además una composición que comprende una pluralidad de partículas de embolización, en donde cada partícula de embolización comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio.

También se proporciona por la invención una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de partículas de embolización como se define en el presente documento y uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La invención también proporciona una partícula de embolización de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones. Se proporciona además una partícula de embolización, composición o composición farmacéutica de la invención, para su uso en embolización.

También se desvela un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende:

- a) administrar a un sujeto una partícula de embolización, una composición, o una composición farmacéutica de la invención; y
- b) dirigir radiación de rayos X, o radiación por haces de protones, a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

La invención proporciona además un proceso de producción de una partícula de embolización que comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio, cuyo proceso comprende: (i) proporcionar una micropartícula; (ii) poner en contacto la micropartícula con una pluralidad de las nanopartículas; y (iii) calentar la micropartícula y las nanopartículas para formar la partícula de embolización.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra micrografías electrónicas de transmisión (TEMs) de nanopartículas de TiO₂ dopadas con Gd (TiO₂:Gd) que muestran tamaño, forma y cristalinidad a dos escalas.

La Figura 2 muestra los resultados de espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDX) que muestran la presencia de gadolinio en partículas de titania dopadas.

La Figura 3 muestra una micrografía electrónica de barrido (SEM) de micropartículas de poliestireno sintetizadas en el laboratorio para dar un intervalo de tamaños.

La Figura 4 muestra la cuantificación del intervalo de tamaños de micropartículas de poliestireno sintetizadas en el laboratorio.

La Figura 5 muestra una imagen de SEM que muestra micropartículas de poliestireno de 39 µm fluorescentes comerciales que se han recubierto con partículas de titania dopadas.

La Figura 6 muestra una imagen de SEM de alta resolución de micropartículas de poliestireno recubiertas con partículas de titanio dopadas.

La Figura 7 muestra los resultados de muerte celular antes (0 Gray) y después (3 Gray) de la exposición a rayos X para células de rhabdomyosarcoma que se incubaron con o bien nanopartículas de titanio dopadas (TiO₂-Gd) o sin dopar (TiO₂) como o bien nanopartículas libres o nanopartículas unidas a poliestireno (PS), o incubadas con PBS como control. Todas las muestras se normalizaron al control.

La Figura 8 muestra el efecto de partículas de titanio dopadas en la supervivencia clonogénica de células HeLa tras la irradiación de 3 Gy.

La Figura 9 muestra el efecto de incubación en condiciones hipóxicas (0,2 % de O₂) sobre la proliferación celular en presencia de nanopartículas de titanio.

La Figura 10 muestra un esquema de un método de formación de una partícula de embolización según la invención.

La Figura 11 muestra que partículas de titanio dopadas son aún radiosensibilizadores eficientes después de recubrir partículas embólicas.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una partícula de embolización que comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio.

La micropartícula está recubierta con la pluralidad de nanopartículas. Es la superficie de la micropartícula la que normalmente se recubre con las nanopartículas. Así, la micropartícula normalmente forma el núcleo de la partícula de embolización y las nanopartículas forman normalmente un recubrimiento, o capa externa, sobre el núcleo. El recubrimiento de las nanopartículas normalmente es continuo, es decir, sustancialmente toda la superficie (por ejemplo, más de 95 % de la superficie) de la micropartícula está recubierta con las nanopartículas. El recubrimiento de nanopartículas normalmente comprende varias capas de nanopartículas y puede tener un espesor de más de 30 nm. El recubrimiento no requiere necesariamente que se requiera material adicional para fijar (recubrir) las nanopartículas a la superficie y las nanopartículas normalmente se adhieren directamente a la superficie de la micropartícula. Como se trata más adelante, las nanopartículas pueden ser sinterizadas con la micropartícula y esto provoca normalmente que las nanopartículas recubran la micropartícula.

Normalmente, el núcleo de la partícula de embolización comprende la micropartícula y la capa más externa de la partícula de embolización comprende las nanopartículas. En algunos casos, el núcleo de la partícula de embolización puede consistir en la micropartícula y la capa más externa de la partícula de embolización puede consistir en las nanopartículas. La micropartícula puede comprender además algunas de las nanopartículas, u otras nanopartículas diferentes.

La partícula de embolización puede tener un diámetro de desde 1 hasta 500 µm, por ejemplo desde 1 hasta 100 µm. Normalmente, el tamaño de la partícula de embolización es desde 5 hasta 100 µm o desde 5 hasta 50 µm. La distribución de tamaños para una pluralidad de partículas de embolización puede corresponder a la vasculatura de un tumor como se trata más adelante.

Como se usa en el presente documento, el término "diámetro" en el contexto de un diámetro de una única partícula se refiere al diámetro de una esfera que tiene el mismo volumen que la partícula. Así, si la partícula es esférica, el diámetro o la partícula es simplemente el diámetro. Si la partícula no es esférica (por ejemplo, esferoidal), entonces el diámetro de la partícula es el diámetro de una partícula esférica que tiene el mismo volumen.

La partícula de embolización normalmente tiene una alta esfericidad. Así, las partículas normalmente son partículas redondeadas. La esfericidad de la partícula de embolización normalmente es desde 0,8 hasta 1,0.

La esfericidad se puede calcular como $\pi^{1/3}(6V_p)^{2/3}/A_p$ donde V_p es el volumen de la partícula y A_p es el área de la partícula. Las partículas perfectamente esféricas tienen una esfericidad de 1,0. Todas las otras partículas tienen una esfericidad inferior a 1,0. La esfericidad media de una pluralidad de las partículas de embolización es normalmente desde 0,8 hasta 1,0. Las partículas pueden ser alternativamente no esféricas, por ejemplo en forma de esferoides achatados o prolatos. La partícula de embolización normalmente tiene una superficie lisa.

Nanopartículas

- 5 El óxido metálico puede ser dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio. El óxido metálico normalmente es dióxido de titanio (también denominado titania). Así, el óxido metálico normalmente es TiO_2 que puede estar en cualquier forma amorfa o cristalina. El TiO_2 puede ser titania anatasa o rutilo. Las nanopartículas pueden comprender óxido de cinc (ZnO) u óxido de cerio (CeO_2 ; también conocido como ceria). Cada nanopartícula puede comprender una o más de dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio. Algunas nanopartículas en la partícula de embolización pueden comprender uno o más de dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio y otras nanopartículas en la partícula de embolización pueden comprender una combinación diferente de uno o más de dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio.
- 10 El uno o más elementos de las tierras raras puede ser cualquier elemento de las tierras raras adecuado seleccionado de la tabla periódica de los elementos. Los elementos de las tierras raras incluyen los elementos lantánidos junto con escandio e itrio. Así, el uno o más elementos de las tierras raras normalmente se seleccionan de Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm e Yb. Las nanopartículas pueden ser dopadas con dos o más elementos de las tierras raras o tres o más elementos de las tierras raras.
- 15 El uno o más elementos de las tierras raras se puede seleccionar de los lantánidos, es decir, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, e Yb o La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm e Yb (excluyendo Pm debido a su radiactividad, aunque dicha radiactividad puede ser deseada en algunas aplicaciones). El uno o más elementos de las tierras raras pueden ser uno o más, dos o más, o tres o más, elementos seleccionados de La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb. El uno o más elementos de las tierras raras se seleccionan preferentemente de Gd, Eu, Er y Nd. El uno o más elementos de las tierras raras pueden incluir Gd. El uno o más elementos de las tierras raras pueden incluir Er. El uno o más elementos de las tierras raras pueden incluir Nd. Preferentemente, el uno o más elementos de las tierras raras incluyen Gd. El óxido metálico se puede dopar con un único elemento de las tierras raras, por ejemplo Gd. El óxido metálico se puede dopar con dos o más de los elementos de las tierras raras.
- 20 El elemento de las tierras raras está generalmente presente como un dopante en la red cristalina hospedadora del óxido metálico en forma de un catión. Cuando el óxido metálico es óxido de cerio, entonces el óxido de cerio se dopa preferentemente con al menos un elemento de las tierras raras distinto de cerio. La nanopartícula puede consistir esencialmente en óxido metálico y el elemento de las tierras raras, por ejemplo que comprende más de o igual a 98 % en peso del óxido metálico y el elemento de las tierras raras.
- 25 La presencia de uno o más elementos de las tierras raras como dopante en la red cristalina hospedadora de dióxido de titanio, óxido de cinc u óxido de cerio permite que estos óxidos metálicos sean excitados por rayos X, u otra radiación ionizante tal como radiación por haces de protones, para generar radicales libres, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS), que tienen uso en el tratamiento de un cuerpo humano o animal. La cantidad de ROS generada por el óxido metálico dopado dependerá de, entre otras cosas, la identidad del dopante de elemento de las tierras raras y la energía de los rayos X usada como parte del tratamiento. Así, el óxido metálico y el (los) elemento(s) de las tierras raras se pueden seleccionar para generar una cantidad adecuada de ROS cuando se usan rayos X de una longitud de onda específica (es decir, energía) como parte del tratamiento. Esto se puede lograr seleccionando un elemento de las tierras raras como dopante que absorbe fuertemente rayos X a una energía que entra dentro del intervalo de energía de los rayos X incidentes.
- 30 En la práctica, el aparato que se usa convencionalmente para generar rayos X para uso médico, tanto para radioterapia como para obtención de imágenes de diagnóstico (por ejemplo, radiografía), tiende a producir rayos X que tienen energías en ciertos intervalos. Normalmente, la energía de los rayos X usados en radioterapia tiende a ser superior a la de los usados para la obtención de imágenes de diagnóstico. Por ejemplo, los rayos X usados en radioterapia pueden tener una energía superior o igual a 0,04 MeV o como se trata adicionalmente a continuación.
- 35 Normalmente, el óxido metálico se dopa con gadolinio (Gd). Preferentemente, el óxido metálico se dopa con gadolinio y uno o más de europio (Eu), erbio (Er) o neodimio (Nd). Así, el óxido metálico se puede dopar preferentemente con Gd y Eu; Gd y Er; Gd y Nd; Gd, Eu y Er; Gd, Eu y Nd; Gd, Er y Nd; o Gd, Eu, Er y Nd. El óxido metálico se puede dopar con gadolinio, europio y erbio.
- 40 El óxido metálico se puede dopar en algunos casos con europio. Preferentemente, el óxido metálico se dopa con europio y uno o más de gadolinio, erbio o neodimio. Así, el óxido metálico se puede dopar preferentemente con Eu y Er; Eu y Nd; o Eu, Er y Nd.
- 45 El óxido metálico se puede dopar, por ejemplo, con erbio. Preferentemente, el óxido metálico se dopa con erbio y uno o más de gadolinio, europio o neodimio. Así, el óxido metálico se puede dopar preferentemente con Er y Eu; o Er y Nd.
- 50 El óxido metálico se puede dopar, por ejemplo, con neodimio. Preferentemente, el óxido metálico se dopa con neodimio y uno o más de gadolinio, europio o erbio. Frecuentemente, el óxido metálico es titanio y el uno o más elementos dopantes comprenden gadolinio.
- 55
- 60
- 65

En general, el óxido metálico se dopa con uno o más elementos de las tierras raras en una cantidad total de desde 0,1 hasta 25 % en moles (por ejemplo 7,5 hasta 25 % en moles), preferentemente 1 hasta 20 % en moles, más preferentemente 2,5 hasta 15 % en moles, especialmente 5 hasta 13,5 % en moles, e incluso más preferido 7,5 hasta 12,5 % en moles. Normalmente, el óxido metálico se dopa con el uno o más elementos de las tierras raras en una cantidad total de desde 0,1 hasta 25 % en moles con respecto a la cantidad de óxido metálico.

El óxido metálico se puede dopar con gadolinio y al menos otro metal de las tierras raras, en donde el óxido metálico se dopa con gadolinio en una cantidad de 1 a 12,5 % en moles, preferentemente desde 5 hasta 10 % en moles.

El óxido metálico se puede dopar con (i) gadolinio en una cantidad de desde 3,5 hasta 12,5 % en peso; (ii) europio en una cantidad de desde 0,5 hasta 1,5 % en peso; y (iii) erbio en una cantidad de desde 0,5 hasta 1,5 % en peso. Por ejemplo, el óxido metálico se puede dopar con (i) gadolinio en una cantidad de desde 5 hasta 10 % en peso; (ii) europio en una cantidad de desde 0,75 hasta 1,25 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 1 % en peso); y (iii) erbio en una cantidad de desde 0,75 hasta 1,25 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 1 % en peso).

El óxido metálico se puede dopar, por ejemplo, con (i) gadolinio en una cantidad de desde 3,5 hasta 12,5 % en moles; (ii) europio en una cantidad de desde 0,5 hasta 1,5 % en moles; y (iii) erbio en una cantidad de desde 0,5 hasta 1,5 % en moles. Más preferentemente, el óxido metálico se dopa con (i) gadolinio en una cantidad de desde 5 hasta 10 % en moles; (ii) europio en una cantidad de desde 0,75 hasta 1,25 % en moles (por ejemplo aproximadamente, 1 % en moles); y (iii) erbio en una cantidad de desde 0,75 hasta 1,25 % en moles (por ejemplo aproximadamente, 1 % en moles).

La cantidad total de uno o más elementos de las tierras raras incorporados como dopante o dopantes en el óxido metálico dependerá de la cantidad molar relativa del elemento de las tierras raras que contiene material de partida con respecto al material de partida usado para preparar el óxido metálico. La cantidad de elemento de las tierras raras incorporado como dopante en el óxido metálico puede depender del método usado para fabricar las partículas, método que se puede adaptar rutinariamente para obtener la cantidad deseada de dopante en las partículas. La cantidad de elemento de las tierras raras como dopante en el (los) óxido(s) metálico(s) se puede medir fácilmente usando técnicas que se conocen bien por un experto en la técnica. La cantidad de elementos de las tierras raras se puede medir, por ejemplo, por espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDX). Cuando están presentes o se usan una pluralidad de partículas de la invención como parte de una terapia o tratamiento, las cantidades anteriores en % en moles se refieren a la cantidad total promedio (es decir, media) del (de los) elemento(s) de las tierras raras que dopan el (los) óxido(s) metálico(s) de las partículas.

Las nanopartículas usadas normalmente tienen un diámetro promedio inferior a 200 nm. El diámetro promedio de las partículas normalmente se mide a partir de imágenes de micrografías electrónicas de transmisión (TEM). El diámetro promedio pueden ser la mediana del diámetro másico (MMD). El MMD es el diámetro para el que la mitad de las partículas en masa son mayores (es decir, tienen un diámetro mayor que MMD) y la mitad son más pequeñas (es decir, tienen un diámetro más pequeño que la MMD). MMD se puede medir por varias técnicas conocidas. La mediana del diámetro másico es una medida bien reconocida de la distribución del tamaño de partículas.

Frecuentemente, las nanopartículas usadas tienen un diámetro promedio inferior a 100 nm. Se prefiere que las nanopartículas tengan un diámetro promedio de desde 1 hasta 100 nm. Más preferentemente, las nanopartículas tienen un diámetro promedio de desde 5 hasta 75 nm (por ejemplo, 10 hasta 75 nm), particularmente desde 10 nm hasta 65 nm.

Las nanopartículas útiles en la partícula de embolización de la invención pueden ser como se describen además en documento de patente WO 2011/070324, cuya totalidad se incorpora en el presente documento como referencia.

Las nanopartículas usadas en la partícula de embolización se pueden sintetizar por cualquier método adecuado, por ejemplo, aquellos descritos en documento de patente WO 2011/070324. Una metodología general puede ser del siguiente modo.

Se combinan uno o más compuestos de elementos de las tierras raras (por ejemplo, sales metálicas) con un primer disolvente y un precursor de óxido metálico (por ejemplo, un alcóxido metálico). La cantidad de compuesto de elemento de las tierras raras que se combina con la disolución determina la cantidad de dopante que se introduce en la red cristalina hospedadora del óxido metálico. Se puede introducir una cantidad total de hasta 25 % en moles de uno o más elementos de las tierras raras en la red cristalina hospedadora del óxido metálico. Como un ejemplo, se añadió 1 milimol de una sal de elemento de las tierras raras a 100 milimoles de precursor de óxido metálico para producir partículas de óxido metálico dopadas con 1 % en moles de elemento de las tierras raras.

La solución se puede entonces añadir gota a gota a un segundo disolvente, opcionalmente mientras se agita vigorosamente. La mezcla se puede agitar durante un adicional tiempo (por ejemplo, desde 1 hasta 15 minutos) y se deja que sedimente el precipitado. Entonces se puede retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con un tercer disolvente y agitar durante un tiempo adicional (por ejemplo, desde 1 hasta 20 min). El sobrenadante normalmente se recoge posteriormente por filtración y opcionalmente se esteriliza luego en autoclave en tubos llenos hasta la

mitad con ddH₂O. Entonces, se seca normalmente la suspensión resultante y opcionalmente se trituran las muestras. Las nanopartículas resultantes pueden ser posteriormente calentadas al fuego, por ejemplo, a una temperatura de desde 300 °C hasta 1000 °C durante un tiempo de desde 1 hasta 10 horas.

5 El compuesto de elemento de las tierras raras normalmente es una sal del elemento de las tierras raras. Así, el compuesto de elemento de las tierras raras normalmente es una sal de haluro, nitrato, sulfato o acetato del elemento de las tierras raras. Preferentemente, el compuesto de elemento de las tierras raras es una sal de nitrato del elemento de las tierras raras. El compuesto de elemento de las tierras raras que es una sal puede estar en forma de un hidrato. Por ejemplo, el uno o más sales de elementos de las tierras raras se puede seleccionar de nitrato de
10 gadolinio (III) hexahidratado, nitrato de europio (III) hidratado, nitrato de terbio (III) pentahidratado, nitrato de neodimio hexahidratado y nitrato de erbio (III) pentahidratado.

El precursor de óxido metálico puede ser cualquier precursor adecuado para el compuesto de óxido metálico, es decir, cualquier compuesto que se convierta en el óxido metálico en condiciones apropiadas, normalmente bajo hidrólisis. El precursor de óxido metálico es frecuentemente un compuesto organometálico que comprende el metal o una sal del metal. Por ejemplo, el precursor de óxido metálico puede ser un alcóxido metálico o un nitrato metálico. El precursor para titanía normalmente es un alcóxido de titanio, por ejemplo isopropóxido de titanio (IV) o etóxido de titanio (IV), preferentemente isopropóxido de titanio (IV). El precursor para ceria normalmente es nitrato de cerio. El precursor para óxido de cinc normalmente es nitrato de cinc.

20 El primer, segundo y tercer disolventes pueden ser cualquier disolvente adecuado. Cada disolvente puede ser un disolvente polar o un disolvente no polar. Normalmente, el primer, segundo o tercer disolvente es un disolvente polar. Los ejemplos de disolventes polares incluyen agua, alcohol disolventes (tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol y n-butanol), disolventes de éter (tales como dimetil éter, dietil éter y tetrahidrofurano),
25 disolventes de éster (tales como acetato de etilo), disolventes de ácido carboxílico (tales como ácido fórmico y ácido etanoico), disolventes de cetona (tales como acetona), disolventes de amida (tales como dimetilformamida y dietilformamida), disolventes de amina (tales como trietilamina), disolventes de nitrilo (tales como acetonitrilo), disolventes de sulfóxido (sulfóxido de dimetilo) y disolventes halogenados (tales como diclorometano, cloroformo y clorobenceno). El primer, segundo o tercer disolvente se pueden seleccionar de disolventes próticos polares. Los ejemplos de disolventes polares próticos incluyen agua, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, ácido fórmico, ácido etanoico. Los ejemplos de disolventes no polares incluyen alcanos (tales como pentano y hexano), cicloalcanos (tales como ciclopentano y ciclohexano) y arenos (tales como benceno, tolueno y xileno). Preferentemente, el disolvente es un disolvente polar. Más preferentemente, el disolvente es un disolvente aprótico polar. Los ejemplos de disolventes apróticos polares incluyen disolventes de cetona (tales como acetona),
35 disolventes de amida (tales como dimetilformamida y dietilformamida), disolventes de nitrilo (tales como acetonitrilo), disolventes de sulfóxido (sulfóxido de dimetilo) y disolventes halogenados (tales como diclorometano, cloroformo y clorobenceno).

Normalmente, el primer, segundo o tercer disolvente comprende un disolvente prótico polar tal como un alcohol. El primer disolvente normalmente comprende muy poca agua, por ejemplo menos de 5 % (o menos de 1 %) en volumen. Así, el primer disolvente puede ser anhidro. El primer disolvente se puede seleccionar de metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol, por ejemplo seleccionar de metanol seco, etanol seco, propanol seco, isopropanol seco y butanol seco.

45 El segundo disolvente normalmente comprende agua. El segundo disolvente puede comprender además un alcohol, por ejemplo metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol, preferentemente isopropanol. El segundo disolvente puede ser, por tanto, una mezcla de agua/isopropanol, por ejemplo en una relación volumen/volumen (v/v) de desde 10/90 hasta 90/10 o 40/60 hasta 60/40. La mezcla de agua/isopropanol normalmente es aproximadamente 50/50 v/v.

50 El tercer disolvente puede ser cualquier disolvente adecuado para lavar las nanopartículas, por ejemplo un éter o un alcohol tal como isopropanol.

Por ejemplo, el método puede ser del siguiente modo: se puede suspender uno o más compuestos de metales de las tierras raras seleccionados de nitrato de gadolinio (III) hexahidratado, nitrato de europio (III) hidratado, nitrato de terbio (III) pentahidratado, nitrato de neodimio hexahidratado y nitrato de erbio (III) pentahidratado en desde 1 hasta
55 100 ml de isopropóxido de titanio (IV) y luego se pueden añadir 10 a 100 ml de isopropanol seco.

La cantidad de compuesto de metal de las tierras raras que se suspende en la solución determina la cantidad de dopante que se introduce en la red cristalina hospedadora de dióxido de titanio. Se puede introducir una cantidad total de hasta 25 % en moles de uno o más elementos de las tierras raras en la red cristalina hospedadora del dióxido de titanio. Como un ejemplo, se añadió 1 milimol de nitrato de gadolinio a 100 milimoles de isopropóxido de titanio para producir partículas de dióxido de titanio dopadas con 1 % en moles de gadolinio.

La solución se puede entonces añadir gota a gota a una mezcla 50/50 (v/v) de agua/isopropanol mientras se agita vigorosamente. La mezcla se puede agitar durante un tiempo adicional (por ejemplo 5 minutos) y el dejar que sedimente el precipitado. Se puede retirar el sobrenadante y lavar el precipitado con isopropanol y agitar durante un

tiempo adicional (por ejemplo 10 minutos). El sobrenadante se puede recoger posteriormente por filtración y luego se esteriliza en autoclave en tubos llenos hasta la mitad con ddH₂O. Entonces, la suspensión se puede mantener a 100 °C hasta que se seque. Las muestras se muelen normalmente dando un polvo fino y posteriormente se calientan al fuego a diversas temperaturas (por ejemplo 3 horas a 700 °C).

Las nanopartículas se pueden producir alternativamente por pirólisis por pulverización de llama (FSP). La FSP es una técnica prometedora para la rápida y escalable síntesis de nanopartículas. Los precursores se disuelven/dispersan en un disolvente altamente exotérmico y se queman en una llama. El mecanismo de formación de partículas se basa en un principio de gas con respecto a materia y se puede dividir en cuatro etapas principales: (i) evaporación/descomposición por pulverización de precursores formando vapor metálico, (ii) nucleación como resultado de supersaturación, (iii) crecimiento por coalescencia y sinterización, y (iv) agregación/aglomeración de partículas.

La producción de las nanopartículas por pirólisis por pulverización de llama normalmente comprende (i) pulverizar una composición que comprende un disolvente y uno o más compuestos precursores (opcionalmente mediante una salida o una boquilla) para producir una pluralidad de gotitas y (ii) combustión de las gotitas de la composición para formar las nanopartículas. El disolvente normalmente es un disolvente altamente exotérmico, por ejemplo un disolvente orgánico inflamable. Por ejemplo, el disolvente puede comprender metanol o etanol. El uno o más compuestos precursores comprenden normalmente óxidos, alcóxidos o carboxilatos de los metales para formar las nanopartículas. Por ejemplo, el uno o más compuestos precursores puede comprender isopropóxido de titanio (IV) y uno o más compuestos de las tierras raras seleccionados de nitrato de gadolinio (III) hexahidratado, nitrato de europio (III) hidratado, nitrato de terbio (III) pentahidratado, nitrato de neodimio hexahidratado y nitrato de erbio (III) pentahidratado. Las nanopartículas producidas por FSP se pueden recoger por filtración. Después de la producción por FSP, las nanopartículas se pueden calentar al fuego calentando hasta una temperatura de desde 300 °C hasta 800 °C durante desde 0,1 hasta 5 horas.

Micropartícula

La partícula de embolización comprende una micropartícula sobre la que se recubren las nanopartículas. La micropartícula puede ser cualquier micropartícula que sea adecuada para su uso en una partícula de embolización. La micropartícula es normalmente una micropartícula que también sería adecuada para su uso solo como una partícula de embolización.

Normalmente, la micropartícula tiene un diámetro de desde 0,1 hasta 500 µm, por ejemplo desde 1 hasta 500 µm. Preferentemente, la micropartícula tiene un diámetro de desde 10 hasta 200 µm. Por ejemplo, la micropartícula puede tener un diámetro de desde 10 hasta 100 µm, por ejemplo desde 20 hasta 90 µm, desde 10 hasta 80 µm, desde 20 hasta 60 µm, o desde 30 hasta 50 µm. Frecuentemente, la micropartícula tiene un diámetro de desde 10 hasta 60 µm.

El material del normalmente que está hecho la micropartícula es un material inerte, por ejemplo un material que es poco probable que reaccione tras la exposición a condiciones ambiente o humedad. La micropartícula es frecuentemente biológicamente inerte. La micropartícula comprende normalmente uno o más materiales seleccionados de un polímero, un metal y un compuesto inorgánico. La micropartícula comprende frecuentemente más de 80 % en peso, más de 90 % en peso o más de 95 % en peso, de un material seleccionado de un polímero, un metal y un compuesto inorgánico. Preferentemente, la micropartícula comprende un polímero. La micropartícula puede comprender más de 80 % en peso, más de 90 % en peso o más de 95 % en peso, de un polímero. La micropartícula puede consistir esencialmente en un polímero (por ejemplo, más de 99 % en peso).

Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen polialquenos, polialquinos, poliéteres, poliamidas, poliésteres y poliacrilatos. Cada uno de estos pueden ser polímeros (es decir, que comprenden un único tipo de monómero) o copolímeros (es decir, que comprenden dos o más tipos diferentes de monómeros). Un copolímero que comprende dos o más unidades de monómero, al menos una de cuyas unidades de monómero deriva de un alqueno, se puede denominar un polialqueno. Los ejemplos de polialquenos incluyen polieteno, polipropeno, poliestireno, copolímero de estireno-divinilbenceno, poli(cloruro de vinilo), poli(alcohol vinílico), polimetilpenteno, polibut-1-eno, poliisobutileno, caucho de etileno-propileno, caucho de monómero de etileno-propileno-dieno. Los ejemplos de polialquinos incluyen polietileno y polipropileno. Los ejemplos de poliéteres incluyen polietilenglicol y polifenil éter. Los ejemplos de poliamidas incluyen poliamida 4, poliamida 6, poliamida 44 y poliamida 66. Los ejemplos de poliésteres incluyen poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de butileno). Los ejemplos de poliacrilatos incluyen poli(metacrilato de metilo) y poli(acrilato de metilo).

La micropartícula puede comprender un metal, normalmente un metal que es inerte a la oxidación en condiciones ambiente. Por ejemplo, el metal se puede seleccionar de metales tales como Fe, Cu, Zn, Ni, Co, Cr, Mn, Ag, Au, Al, Pt, Pd, Rh y V.

La micropartícula puede comprender un compuesto inorgánico, compuesto inorgánico que normalmente es insoluble. El compuesto inorgánico puede ser, por ejemplo, sílice o alúmina.

Preferentemente, la micropartícula comprende un polímero o copolímero. La micropartícula puede comprender más de 90 % en peso o más de 95 % en peso de un polímero o copolímero. Normalmente, la micropartícula comprende uno o más polímeros o copolímeros seleccionados de polialquenos, poliacrilatos, poliésteres y poliéter. El polímero o copolímero está preferentemente reticulado.

Preferentemente, la micropartícula comprende un polímero o copolímero formado a partir de unidades de monómero de estireno. La micropartícula puede comprender poliestireno o copolímero de estireno y otro monómero, por ejemplo un diacrilato o divinilbenceno. Por ejemplo, la micropartícula puede comprender un copolímero de estireno y un diacrilato, diacrilato que se puede seleccionar de dimetacrilato de etilenglicol, diacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de propilenglicol, diacrilato de propilenglicol, dimetacrilato de poli(etilenglicol), diacrilato de poli(etilenglicol), dimetacrilato de poli(propilenglicol), diacrilato de poli(propilenglicol), diacrilato de hexano-1,6-diol y dimetacrilato de hexano-1,6-diol. Preferentemente, la micropartícula comprende un copolímero de estireno y dimetacrilato de etilenglicol, o un polímero que es poliestireno. El peso molecular del polímero o copolímero puede ser cualquier valor adecuado.

El polímero usado en la micropartícula puede ser obtenible por copolimerización en suspensión de estireno y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA). Por ejemplo, se pueden crear una fase de aceite mezclando estireno y EGDMA con un iniciador tal como azobisisobutironitrilo (AIBN; Aldrich). La fase aceitosa se puede entonces añadir a poli(alcohol vinílico) acuoso.

El espesor del recubrimiento de nanopartículas normalmente es desde 10 hasta 300 nm. Por ejemplo, el espesor del recubrimiento de nanopartículas puede ser desde 10 hasta 100 nm o desde 20 nm hasta 80 nm. La partícula de embolización puede comprender desde 0,1 hasta 50 % en peso de nanopartículas, por ejemplo desde 1 hasta 10 % en peso.

Modalidad adicional de partículas de embolización

Se pueden introducir características adicionales en las partículas de embolización de la invención, produciéndose así partículas de embolización multimodales. Por ejemplo, las partículas de embolización también pueden incorporar agentes de obtención de imágenes tales como fluoróforos o metales pesados tales como tántalo como agentes de contraste de rayos X (no magnéticos, así se permite al paciente someterse a IRM), o se pueden combinar con quimioembolización (una mezcla de nanopartículas de sílice mesoporosa y nanopartículas de titanía).

Por ejemplo, la partícula de embolización puede comprender además una pluralidad de nanopartículas radiopacas. Normalmente, las partículas radiopacas son radiopacas con respecto a los rayos X. Las nanopartículas radiopacas pueden formar parte del recubrimiento sobre la partícula de embolización o pueden formar parte de la micropartícula. Normalmente, las nanopartículas radiopacas se incorporan en la micropartícula. Así, las nanopartículas radiopacas pueden formar parte del núcleo de la partícula de embolización, por ejemplo, siendo incorporadas en la estructura de la micropartícula. Las nanopartículas radiopacas normalmente se incorporan en la micropartícula añadiendo las nanopartículas radiopacas a la mezcla de reacción de la que se produce la micropartícula.

Las nanopartículas radiopacas normalmente comprenden óxido de tántalo, oro o sulfuro de bismuto (III). Preferentemente, las nanopartículas radiopacas comprenden óxido de tántalo. Las partículas radiopacas pueden tener un diámetro promedio de desde 10 hasta 100 nm.

Las nanopartículas radiopacas que comprenden óxido de tántalo se pueden producir por el método que se describe en Oh et al., J Am Chem Soc 2011;133(14):5508-5515. Normalmente, las nanopartículas de óxido de tántalo se producen hidrolizando etóxido de tántalo (V).

La partícula de embolización puede comprender adicionalmente desde 0,1 hasta 10 % en peso de las nanopartículas radiopacas.

La partícula de embolización puede comprender adicionalmente o alternativamente además un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente quimioterapéutico adecuado. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser uno o más agentes seleccionados de agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimicrotúbulos, inhibidores de la topoisomerasa y antibióticos citotóxicos. El agente quimioterapéutico se puede seleccionar de ofiobolina A, ofiobolina C, alcaloides de la vinca, taxanos, inhibidores de dihidrofolato reductasa, inhibidores de timidilato sintasa, inhibidores de adenosina desaminasa, tiopurinas, inhibidores de ADN polimerasa, agentes hipometilantes, campototheca, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, carboplatino, cisplatino y nedaplatino.

El agente quimioterapéutico normalmente se incorpora en nanopartículas en la partícula de embolización. La partícula de embolización puede, por tanto, comprender además una pluralidad de nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico.

Las nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico normalmente están recubiertas sobre la superficie de la micropartícula. Así, el recubrimiento sobre la micropartícula puede comprender una mezcla de las nanopartículas de óxido metálico dopadas con tierras raras descritas anteriormente y nanopartículas que comprenden un agente quimioterapéutico.

5 Las nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico normalmente son nanopartículas de sílice. Las nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico pueden tener un diámetro promedio de desde 10 hasta 100 nm. Las nanopartículas de sílice se pueden producir hidrolizando ortosilicato de tetraetilo (por ejemplo, como se describe en Horn et al, Small. 2010; 6(11):1185-90). Las nanopartículas que comprenden un agente quimioterapéutico pueden ser como se describen en Morrison et al., Pharm Res (2014) 31:2904-2917.

La partícula de embolización puede comprender adicionalmente desde 0,1 hasta 10 % en peso del agente quimioterapéutico.

15 Las nanopartículas usadas en la invención pueden comprender adicionalmente al menos un resto diana. Normalmente, el resto diana es un péptido, un polipéptido, un ácido nucleico, un nucleótido, un lípido, un metabolito, un anticuerpo, un ligando de receptor, un receptor de ligando, una hormona, un azúcar, una enzima, una vitamina o similares. Por ejemplo, el resto diana se puede seleccionar de un fármaco (por ejemplo, trastuzumab, gefitinib, PSMA, tamoxifeno/toremifeno, imatinib, gemtuzumab, rituximab, alemtuzumab, cetuximab), un inhibidor de la ADN topoisomerasa, un antimetabolito, un compuesto que se dirige al ciclo celular de la enfermedad, un marcador de expresión génica, un ligando que se dirige a angiogénesis, un marcador tumoral, un ligando que se dirige a receptor de folato, un ligando que se dirige a célula apoptótica, un ligando que se dirige a hipoxia, un intercalador de ADN, un ligando que se dirige a receptor de enfermedad, un marcador de receptor, un péptido (por ejemplo, un péptido señal, un péptido de hormona estimulante de melanocitos (MSH)), un nucleótido, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), un anticuerpo monoclonal C225, un anticuerpo monoclonal CD31, un anticuerpo monoclonal CD40), una molécula antisentido, un ARNip, un pentapéptido de glutamato, un agente que imita glucosa, amifostina, angiostatina, capecitabina, desoxicitidina, fulereno, herceptina, albúmina de suero humano, lactosa, quinazolina, talidomida, transferrina y trimetil-lisina. Preferentemente, el resto diana es un péptido señal de localización nuclear (NLS). Un ejemplo de un péptido NLS es PPKKKRKV o CGGFSTSLRARKA. Preferentemente, el péptido NLS es CGGFSTSLRARKA.

Composición

35 La invención también proporciona una composición que comprende una pluralidad de partículas de embolización, en donde cada partícula de embolización comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio. Las partículas de embolización pueden ser como se ha definido adicionalmente anteriormente en este documento.

40 La distribución del tamaño de partículas de las partículas de embolización en la composición puede ser cualquier distribución adecuada. Normalmente, las partículas de embolización tienen un diámetro promedio de desde 10 hasta 200 µm.

45 La distribución del tamaño de partículas de las partículas de embolización de la invención puede variar hasta corresponder estrechamente a las distribuciones de diámetro vascular encontradas en diversos tumores y, por tanto, ocluyen más eficazmente la vasculatura dentro del tumor. Esto permite la eficaz embolización de la vasculatura deseada. En una realización, la pluralidad de partículas de embolización según la invención tienen un diámetro promedio similar en valor a (por ejemplo, un valor entre 90 y 100 % de) el diámetro medio de la vasculatura en el tumor que se va a tratar. Por ejemplo, el diámetro promedio de las partículas de embolización puede ser desde 15 hasta 200 µm, desde 10 hasta 100 µm, o desde 20 hasta 50 µm.

Los ejemplos del diámetro de vasculatura en diversos tumores se dan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

| Humano o animal | Tipo de tumor | Tamaño de estudio | Diámetro de vasculatura medido | Distribución de tamaños de vasos medida |
|-----------------|---------------|-------------------|---|---|
| Humano | Próstata | 572 pacientes | Media = 25,2 µm Intervalo = 12,9-55,6 µm | No informada |
| Humano | Próstata | pacientes | Media = 24,4 µm | No informada |
| Humano | De laringe | 16 pacientes | Intervalo = 5- >60 µm | 75 % fueron 5-20 µm 1 % fue >60 µm |
| Ratón | Colorrectal | 15 tumores | Intervalo = 2-55 µm | 75 % fueron < 80 µm |
| Ratón | Colon | 1500 vasos | Intervalo = 4-29 µm | No informada |

| Humano o animal | Tipo de tumor | Tamaño de estudio | Diámetro de vasculatura medido | Distribución de tamaños de vasos medida |
|-----------------|--|--------------------|--|---|
| Ratón | Carcinomas de mama | 6 tumores | Media = 39 μm Intervalo = 0-225 μm | La mayoría de los vasos tuvieron 0-50 μm |
| Ratón | Adenocarcinoma epitelial cervical humano | 25 vasos | Intervalo = 5-60 μm | No informada |
| Rata | Adenocarcinoma de mama | 4 tumores | Intervalo = 5-225 μm | La mayoría de los vasos fueron pequeños |
| Rata | Colon | 22 tumores | Intervalo = 5-100 μm | La mayoría de los vasos tuvieron 5-50 μm |
| Rata | Glioma | 3138 vasos medidos | Media = 16,8 μm Intervalo = 1-50 μm | El tamaño máximo de vaso fue 10 μm |

Composiciones farmacéuticas y uso

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de partículas de embolización como se define en el presente documento y uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las partículas de embolización de la invención normalmente se administran por vía parenteral, tanto por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraesternal, por vía transdérmica como por técnicas de infusión. Así, la composición farmacéutica normalmente es adecuada para administración parenteral. Preferentemente, la composición farmacéutica es adecuada para administración parenteral intravenosa.

10 Las suspensiones y emulsiones pueden contener como excipiente, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o poli(alcohol vinílico). La suspensión o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un diluyente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

15 Las soluciones para inyección o infusión pueden contener como diluyente, por ejemplo, agua estéril o preferentemente pueden estar en forma de soluciones salinas isotónicas acuosas estériles.

20 Normalmente, la concentración de las partículas de embolización en la composición farmacéutica es desde 100 partículas/ml hasta 10^{10} partículas/ml, por ejemplo desde 10^4 partículas/ml hasta 10^8 partículas/ml. Frecuentemente, el número total de partículas de embolización en la composición puede ser desde 10 hasta 10^6 , o desde 20 hasta 10000.

25 En general, la composición farmacéutica comprenderá una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas de la invención. Se apreciará por un experto en la técnica que las dosificaciones apropiadas de las partículas y una composición farmacéutica que comprende las partículas puede variar de paciente a paciente. La determinación de la dosificación óptima implicará generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico mediante la embolización y la liberación de ROSs contra cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación de las partículas, la duración del tratamiento, otros compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, afección, salud general, y antecedentes personales previos del paciente. La cantidad de partículas y la vía de administración serán por último lugar a criterio del médico, veterinario o profesional clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones locales en el sitio de acción que logran el efecto deseado.

30 La invención también proporciona una partícula de embolización como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones. Normalmente, el tratamiento es en combinación con radiación de rayos X. El cáncer normalmente es cáncer de pulmón, hígado, riñón, vejiga, mama, cabeza y cuello, cerebro, ovario, próstata, intestino, colon, recto, útero, páncreas, ojo, médula ósea, sistema linfático o glándula tiroides.

35 La partícula de embolización de la invención contiene nanopartículas que se ha encontrado que son radioterapéuticamente eficaces en condiciones hipóxicas. La eficacia de la radioterapia convencional se basa en un suministro adecuado de oxígeno a las células tumorales; sin embargo, está ahora bien establecido que los tumores sólidos humanos contienen una fracción sustancial de células que son hipóxicas. Esta hipoxia crónica que se observa en tumores se denomina frecuentemente la hipoxia limitada por difusión puesto que surge de la gran distancia intervascular que está más allá del límite de difusión de oxígeno (se estima que es entre 75 y 200 μm). La hipoxia limitada por perfusión 'aguda' transitoria adicionalmente limitada puede ocurrir debido a la circulación

50

sanguínea inestable en vasos, que da como resultado periodos de tiempo cuando se disminuye o bloquea la circulación sanguínea a una región. Cuando el tejido se vuelve hipóxico, se activan varias vías de señalización, alterando el comportamiento de las células para permitir que se adapten a la privación de oxígeno. Estos incluyen un aumento en la capacidad de glucólisis anaerobia para la producción de energía y median *in vivo* en cambios en la circulación sanguínea y estimulan la angiogénesis. Sin embargo, en el contexto de la radioterapia, la concentración de oxígeno durante, o en el plazo de milisegundos desde la irradiación, es crítica en la determinación del daño al ADN y la posterior respuesta biológica, con la eficacia biológica de una dosis significativamente mayor dada para células bien oxigenadas en comparación con las células hipóxicas. Para la relación de aumento de oxígeno (OER, definida como la relación de dosis bajo hipoxia en comparación con las condiciones aireadas requeridas para producir el mismo efecto biológico) de rayos X normalmente se informan valores de entre 2,5 y 3,5 para un intervalo de criterios de valoración biológicos que incluyen la supervivencia clonogénica. La mejora de la eficacia de la radioterapia usando radiosensibilizadores que pueden actuar en condiciones hipóxicas (y también normóxicas) sería una forma prometedora de lograr el resultado terapéutico mejorado. Se han descrito en la bibliografía varios radiosensibilizadores para células hipóxicas. Estos son principalmente los nitroimidazoles que se encuentra que imitan el efecto de oxígeno en los procesos radioquímicos (Adams GE: Cancer (ed 6). New York, NY, F.F. Becker Plenum Press, 1977; Wardman P: Clin Oncol (R Coll Radiol) 2007; 19: 397 - 417). Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos han fracasado en demostrar una eficacia significativa usando estos sensibilizadores, principalmente debido a que efectos secundarios no deseables tales como neurotoxicidad (Kaanders JH, Bussink J, van der Kogel AJ: Semin Radiat Oncol 2004, 14: 233-240). La actividad de las partículas de titanio dopadas para actuar de radiosensibilizadores en condiciones normóxicas se describe en Townley HE, Rapa E, Wakefield G, Dobson P., Nanomedicine 2012; 8: 526-36. Puesto que la generación de electrones a partir de titanio no debe ser dependiente de la presencia de oxígeno molecular, los presentes inventores buscaron investigar si las nanopartículas todavía mostraban radiosensibilización eficaz en condiciones hipóxicas.

El cáncer que se va a tratar se puede asociar, por tanto, a tejido tumoral que comprende células tumorales hipóxicas. Un cáncer está "asociado" con tejido tumoral si ese tejido tumoral es una característica del cáncer, es decir, si el tumor se provoca por el cáncer. Las células tumorales que son hipóxicas son células tumorales que tienen una menor concentración de oxígeno en comparación con las células normóxicas. Las células tumorales hipóxicas incluyen, por tanto, células tumorales anóxicas, es decir, células que tienen una concentración de oxígeno de sustancialmente 0,0. Normalmente, la presión parcial del oxígeno, pO₂, en una célula hipóxica es al menos 3 mmHg por debajo de la pO₂ en una célula normóxica, por ejemplo al menos 10 mmHg por debajo de la pO₂ en una célula normóxica. Frecuentemente, esto da como resultado una pO₂ en la célula hipóxica inferior a 80 mmHg, por ejemplo desde 20 hasta 60 mmHg, o por ejemplo desde 20 hasta 40 mmHg. La hipoxia puede ser hipoxia limitada por la difusión que surge de una gran distancia intervascular en el tumor. La hipoxia puede ser hipoxia limitada por la perfusión 'aguda' transitoria debido a circulación sanguínea inestable en los vasos. La hipoxia limitada por la perfusión puede ocurrir debido a la embolización y es, por tanto, beneficio significativo que las nanopartículas en la partícula de embolización de la invención sean radioterapéuticamente activas en condiciones hipóxicas.

La invención proporciona además una composición farmacéutica como se define en el presente documento para su uso en el tratamiento de cáncer como se define en el presente documento en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones.

En el tratamiento de cáncer, las partículas de embolización tienen el efecto combinado de embolizar el tumor, así como tratar radioterapéuticamente el tumor mediante la producción de ROS. Las partículas de embolización se acumulan en la vasculatura del tumor. Esto tanto emboliza el tumor como también fija las partículas en el sitio en el tumor permitiendo el tratamiento preciso del tumor (o sitio de cáncer) usando rayos X (o una haz de protones). El tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X normalmente comprende:

- a) administrar por vía parenteral la composición o la composición farmacéutica a un sujeto que se va a tratar; y
- b) dirigir radiación de rayos X a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

El tratamiento de cáncer en combinación con radiación por haces de protones normalmente comprende:

- a) administrar por vía parenteral la composición o la composición farmacéutica a un sujeto que se va a tratar; y
- b) dirigir radiación por haces de protones a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

Normalmente, la etapa de dirigir radiación de rayos X o por haces de protones a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral se realiza directamente después de administrar las partículas a un sujeto por inyección. En algunos casos, puede ser necesario dejar un corto periodo de tiempo para que las partículas se extiendan por todo el tejido tumoral, sitio de cáncer o vasculatura antes de dirigir radiación de rayos X o por haces de protones al lugar. En general, la etapa de dirigir radiación de rayos X (o radiación por haces de protones) a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral se lleva a cabo en el plazo de 1 hora después de administrar la partícula o la composición farmacéutica al sujeto. Preferentemente, la etapa de dirigir radiación de rayos X o por haces de protones a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral se lleva a cabo en el plazo de 45 minutos después de, más preferentemente en el plazo de 30 minutos después de, particularmente en el plazo de 15 minutos después de, especialmente en el plazo de 10 minutos después de, incluso más preferentemente en el plazo de 5 minutos, o inmediatamente después de administrar la

partícula o la composición farmacéutica al sujeto.

La composición administrada al sujeto normalmente comprende un número total de partículas de embolización de desde 10 hasta 10^6 , o desde 20 hasta 10000. Frecuentemente, la composición administrada comprende desde 20 hasta 1000 partículas de embolización, por ejemplo desde 40 hasta 400 partículas de embolización.

Generalmente, el sujeto se expone a una dosis de rayos X total de desde 1 hasta 200 Gy o 20 hasta 70 Gy, tal como por ejemplo 40 hasta 50 Gy. Una dosis de rayos X individual puede ser desde 0,1 hasta 10 Gy. Normalmente, un tratamiento o método de tratamiento de cáncer de la invención comprende dirigir una dosis de 1,0 a 3,0 Gy, preferentemente 1,5 a 2,5 Gy, más preferentemente una dosis de 1,8 a 2,0 Gy de radiación de rayos X a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. Dichas pequeñas dosis frecuentes están previstas para permitir a las células sanas tiempo para crecer para reparar cualquier daño provocado por la radiación. La dosis de radiación por haces de protones puede ser desde 1 hasta 2000 Gy, 1 hasta 500 Gy, o cualquiera de las dosis dadas anteriormente.

Normalmente, la radiación de rayos X en un tratamiento o método de tratamiento de cáncer de la invención tiene una energía desde 0,005 MeV hasta 10 MeV. Los rayos X de energía más alta (por ejemplo, más de 1 MeV) se pueden denominar algunas veces rayos gamma. La radiación de rayos X puede tener una energía de desde 0,005 MeV hasta 1 MeV, o desde 0,05 MeV hasta 0,2 MeV. Por ejemplo, el tratamiento de cáncer según la invención puede usar radiación de rayos X que tiene una energía superior o igual a 0,01 MeV. Alternativamente, el tratamiento puede usar radiación por haces de protones que tiene una energía superior o igual a 1 MeV, por ejemplo desde 70 hasta 250 MeV. La energía de la radiación de rayos X usada en el tratamiento de cáncer normalmente es superior o igual a 0,05 MeV, por ejemplo superior o igual a 0,06 MeV o superior o igual a 0,06 MeV. La energía de rayos X para tratar cáncer puede ser desde 0,04 hasta 0,1 MeV o desde 0,06 hasta 0,09 MeV. La energía de los rayos X usada para el tratamiento del cáncer según la invención normalmente tiene una energía mayor que la usada para fines de obtención de imágenes.

La etapa de dirigir radiación de rayos X o radiación por haces de protones al lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral normalmente excita el óxido metálico en las nanopartículas en las partículas de embolización en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral para generar especies reactivas de oxígeno en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

El método también puede comprender una etapa de detectar la presencia o ausencia de una partícula o partículas de la invención en un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral antes de dirigir radiación de rayos X a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. Normalmente, la etapa de detectar la presencia o ausencia de la partícula o partículas en un lugar o sitio comprende dirigir rayos X al lugar o sitio para obtener una imagen de rayos X. La imagen de rayos X se puede usar entonces para determinar si un cáncer o tejido tumoral está presente o ausente en el lugar o sitio. Para usos de diagnóstico, el tiempo de exposición de un sujeto a rayos X es generalmente desde un segundo hasta 30 minutos, preferentemente desde un minuto hasta 20 minutos y más preferentemente desde un segundo hasta 5 minutos.

El tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X (o radiación por haces de protones) puede comprender, por ejemplo:

a) administrar, preferentemente administrar por vía parenteral, la composición o la composición farmacéutica a un sujeto que se va a tratar;

ai) dejar que las partículas de embolización se acumulen en un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral;
aii) opcionalmente detectar la presencia o ausencia de las partículas de embolización en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral; y

b) dirigir radiación de rayos X (o radiación por haces de protones) al lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

Las partículas de embolización normalmente se acumulan en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral por embolización de la vasculatura dentro del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. Esto tanto restringe la circulación sanguínea al tumor como pone las partículas de embolización dentro del tumor en una posición adecuada para tratar radioterapéuticamente el cáncer tras la exposición a rayos X o un haz de protones. Así, el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X (o radiación por haces de protones), según la presente invención, normalmente comprende una etapa de dejar que las partículas de embolización embolice la vasculatura dentro de un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. De hecho, la etapa (ai) de la realización descrita en el párrafo precedente puede comprender: dejar que las partículas de embolización se acumulen en un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral y embolizar la vasculatura dentro de dicho lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

La etapa (a) normalmente comprende administrar por vía intravenosa la pluralidad de partículas de embolización o la composición farmacéutica al sujeto que se va a tratar.

Preferentemente, la etapa (a) comprende administrar por vía intravenosa la pluralidad de partículas de embolización o la composición farmacéutica en la corriente sanguínea del sujeto que se va a tratar en una localización en o antes

del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. El término "antes del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral", como se usa en el presente documento, significa aguas arriba en la circulación sanguínea del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral, es decir, en una localización en la vasculatura donde la sangre se está alejando del corazón y hacia el sitio o lugar del cáncer o tejido tumoral.

5 Las partículas de embolización también se podrían usar en sintonía con nanopartículas dopadas como se define en el presente documento inyectadas directamente en el cuerpo del tumor.

10 La invención también proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende: (a) administrar a un sujeto una partícula de embolización como se define en el presente documento, una composición como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento; y (b) dirigir radiación de rayos X o radiación por haces de protones a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral. Este método se puede definir adicionalmente para el uso en el tratamiento de cáncer descrito anteriormente. Normalmente, (a) comprende administrar por vía intravenosa a un sujeto una partícula de embolización como se define en el presente documento, una pluralidad de partículas de embolización como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento. Preferentemente, (a) comprende administrar por vía intravenosa en la corriente sanguínea del sujeto que se va a tratar en una localización en o antes del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral, una partícula de embolización como se define en el presente documento, una composición como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento.

20 La invención también proporciona el uso de una partícula de embolización como se define en el presente documento, una composición como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer como se define en el presente documento en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones.

25 La invención también proporciona una partícula de embolización como se define en el presente documento, una composición como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento, para su uso en un método de embolización. La embolización normalmente comprende administrar por vía intravenosa la pluralidad de partículas de embolización o la composición farmacéutica en la corriente sanguínea del sujeto que se va a tratar en una localización en o antes del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

30 El tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X (o por haces de protones) se puede realizar simultáneamente con la embolización. Así, la invención también proporciona una partícula de embolización como se define en el presente documento, una composición como se define en el presente documento, o una composición farmacéutica como se define en el presente documento, para su uso en un método de embolización en combinación con el tratamiento de cáncer como se define en el presente documento en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones.

Proceso de producción de las partículas de embolización

35 La invención también proporciona un proceso de producción de una partícula de embolización que comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio, cuyo proceso comprende:

- 40 (i) proporcionar una micropartícula;
- 50 (ii) poner en contacto la micropartícula con una pluralidad de las nanopartículas; y
- (iii) calentar la micropartícula y las nanopartículas para formar la partícula de embolización.

La partícula de embolización puede ser como se define adicionalmente en el presente documento. Las nanopartículas pueden ser como se definen adicionalmente en el presente documento. La micropartícula puede ser como se define adicionalmente en el presente documento.

55 Normalmente, (i) comprende proporcionar una pluralidad de micropartículas. Normalmente, (ii) comprende mezclar la micropartícula con la pluralidad de nanopartículas, por ejemplo mezclar una pluralidad de micropartículas con la pluralidad de nanopartículas. Las micropartículas y nanopartículas se mezclan normalmente en la fase sólida. Así, una composición sólida (por ejemplo, un polvo) que comprende la pluralidad de micropartículas se puede mezclar con una composición sólida (por ejemplo, un polvo) que comprende la pluralidad de nanopartículas. El volumen de nanopartículas es normalmente mayor que el volumen de micropartículas en la mezcla. Se desea un mayor volumen de nanopartículas tal que exista un exceso de nanopartículas y las micropartículas se recubran completamente antes y durante la etapa (iii). El exceso de nanopartículas también ayuda a producir partículas de embolización individuales en vez de grumos de partículas de embolización agregadas. La relación volumen/volumen (v/v) entre micropartículas y nanopartículas (micropartículas:nanopartículas) normalmente es desde 1:1 hasta 1:20. Por

ejemplo, la relación puede ser desde 1:5 hasta 1:15 o desde 1:8 hasta 1:10 (v/v).

Las partículas de embolización se forman calentando la combinación de las micropartículas con las nanopartículas. Esto provoca que las nanopartículas se unan entre sí y/o la superficie de la micropartícula para formar la partícula de embolización. Normalmente, la micropartícula comprende un polímero (por ejemplo, un polímero o un copolímero formado de unidades de monómero de estireno) y (iii) comprende calentar la micropartícula y las nanopartículas a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero. Normalmente, (iii) comprende calentar la micropartícula y las nanopartículas a una temperatura de desde 150 °C hasta 300 °C. La temperatura puede ser desde 200 °C hasta 250 °C, por ejemplo aproximadamente 230 °C. El calentamiento se realiza normalmente durante desde 5 hasta 60 minutos, por ejemplo desde 10 hasta 20 minutos.

Después de la formación de las partículas de embolización, normalmente se aíslan de la mezcla, por ejemplo, tamizando o usando un gradiente de densidad, para retirar las partículas de embolización más grandes y dejar el exceso de nanopartículas.

Un ejemplo del proceso de producción es del siguiente modo. Se mezclaron las micropartículas con las nanopartículas en una relación de desde 1:5 hasta 1:15 (v/v). Entonces se sinterizaron las nanopartículas sobre la superficie de las micropartículas calentando la mezcla hasta desde 200 °C hasta 250 °C. Esto se puede hacer en un horno a una tasa de incremento de desde 5 °C hasta 10 °C por minuto. La mezcla se mantuvo a desde 200 °C hasta 250 °C durante desde 5 hasta 20 minutos. Las partículas de embolización se pueden separar entonces del exceso de nanopartículas usando un gradiente de densidad de sacarosa que contiene 60 % y 15 % de sacarosa y centrifugando (por ejemplo, 1 hora a 9.000 rpm). Se extrajo la banda que contenía las micropartículas recubiertas, se centrifugó y se lavó. Finalmente, se secaron las partículas preparadas durante la noche a vacío. Las nanopartículas usadas en la invención se podrían añadir a la superficie de las micropartículas ya sea simultáneamente a la síntesis o posterior a la síntesis.

Alternativamente, la etapa (iii) puede comprender añadir una composición a las micropartículas y nanopartículas, composición que une las nanopartículas a la superficie de la micropartícula. La composición añadida puede ser una composición adhesiva, por ejemplo una solución de poli(alcohol vinílico), un epóxido, un uretano, o un metacrilato. La composición añadida puede ser una composición de resina.

La invención también proporciona una partícula de embolización obtenible por un proceso de producción de una partícula de embolización como se describe en el presente documento.

La invención se describe con más detalle por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Producción de nanopartículas dopadas

Se prepararon nanopartículas que comprenden titanía dopada con la tierra rara gadolinio. El método de producción de estas partículas fue del siguiente modo.

Se suspendió nitrato de gadolinio (III) hexahidratado en 10 ml de isopropóxido de titanio (IV) y luego se añadieron 30 ml de isopropanol seco.

La cantidad de compuesto de metal de las tierras raras que se suspende en la solución determina la cantidad de dopante que se introduce en la red cristalina hospedadora del dióxido de titanio. Se puede introducir una cantidad total de hasta 25 % en moles de uno o más elementos de las tierras raras en la red cristalina hospedadora del dióxido de titanio. Como un ejemplo, se añadieron 34 micromoles de nitrato de gadolinio a 340 milimoles de isopropóxido de titanio para producir partículas de dióxido de titanio dopadas con 1 % en moles de gadolinio.

Entonces se añadió gota a gota la solución a 500 ml de una mezcla 50/50 (v/v) de agua/isopropanol mientras se agitaba vigorosamente. La mezcla se agitó durante 5 minutos adicionales y entonces se dejó que el precipitado sedimentara. Se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 ml de isopropanol y se agitó durante 10 minutos adicionales. Posteriormente se recogió el sobrenadante por filtración y luego se esterilizó en autoclave en tubos llenos hasta la mitad con ddH₂O. Entonces se mantuvo la suspensión a 100 °C hasta que se secó. Se molieron las muestras dando un polvo fino y posteriormente se calentaron al fuego a diversas temperaturas (por ejemplo, 3 horas a 700 °C).

El método anterior se puede usar para preparar otras partículas de dióxido de titanio dopadas con tierras raras cuando se usan compuestos de nitrato de metal de las tierras raras alternativos. El método anterior también se puede usar para preparar óxido de cerio u óxido de cinc dopado con tierras raras cuando se usa un cetonato de cerio o cinc, tal como acetilacetato de cinc o acetilacetato de cerio, como material de partida.

Las imágenes de TEM muestran el tamaño y la distribución de tamaños de nanopartículas de titanía dopadas con

gadolinio (Figura 1; superior) y su cristalinidad (Figura 1; inferior). El trazo de EDX (Figura 2) confirma la presencia de gadolinio en las nanopartículas de titanio.

5 También se sintetizaron nanopartículas dopadas usando pirólisis por pulverización de llama (FSP) para confirmar que también era posible este método. En un experimento típico, se añadieron las cantidades apropiadas de precursor(es) de titanio y gadolinio para un 5 % de átomos de Gd en TiO_2 a un disolvente y se agitó durante 1 hora. Se pulverizó la solución a través de una boquilla. La pulverización se definió por la velocidad de la inyección de precursor y la velocidad del gas de dispersión de O_2 y se prendió con una llama piloto hecha de metano y oxígeno establecida a 1,5 y 3,2 l/min respectivamente. Resultó un polvo de la combustión de los precursores y se recogió a vacío sobre un papel de filtro de fibra de vidrio. Finalmente, el polvo blanco se calentó al fuego a 500 °C durante 2 horas.

Ensayo de Arsenazo III sobre nanopartículas dopadas

15 Se recubrieron con sílice nanopartículas de titanio dopadas con 5 % de gadolinio preparadas por FSP ($\text{TiO}_2@5\% \text{Gd}$ (FSP)@Si) y se analizaron para lixiviación de gadolinio usando el ensayo de Arsenazo III. La muestra se resuspendió en agua Milli-Q, se sonicó y se filtró. Se diluyó la muestra (1:401) y se recogieron tres espectros de UV-VIS para la muestra. Se determinaron los valores de absorbancia a 300 nm. Basándose en una curva de calibración para P25, se calculó la concentración inicial de la muestra después de la filtración (5,45 mg/ml). Se inyectaron 500 μl de la muestra en el casete de diálisis Slide-A-Lyser (ThermoScientific) y se dializó contra agua Milli-Q (55 ml) con agitación constante a temperatura ambiente. Se usó nitrato de gadolinio (III) hexahidratado como fuente de gadolinio libre en un experimento de control positivo. Se inyectaron 500 μl del cloruro de gadolinio (III) hexahidratado (0,788 mg/ml) en el casete de diálisis Slide-A-Lyser (ThermoScientific) y se dializó contra agua (55 ml) con agitación constante a temperatura ambiente. Además, se inyectaron 500 μl de muestra de $\text{TiO}_2@5\% \text{Gd}$ (FSP) sin recubrir (5,45 mg/ml) en el casete de diálisis Slide-A-Lyser (ThermoScientific) y se dializó contra agua (55 ml) con agitación constante a temperatura ambiente.

Se evaluó el agua ("Sumidero") para gadolinio libre después de 1 día de diálisis, y hasta 14 días. Se prepararon las muestras para la medición mezclando 100 μl de Arsenazo III 0,2 mM y 900 μl de sumidero. Se prepararon blancos mezclando 100 μl de Arsenazo III 0,2 mM y 900 μl de agua Milli-Q. Todas las muestras de sumidero se recogieron para análisis adicional por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Micropartículas

35 Las micropartículas de poliestireno se pueden preparar o bien en el laboratorio o bien se pueden usar patrones comerciales. Las micropartículas se pueden preparar o comprar como un intervalo de tamaños. El tamaño de los vasos sanguíneos a bloquear variará en diámetro desde los vasos sanguíneos principales que suministran al tumor hasta los vasos internos más pequeños (véase la Tabla 1 anteriormente). Las micropartículas se pueden aplicar, por tanto, como una colección heterogénea de diámetros (Figuras 3 y 4) o como un diámetro más estrechamente controlado (Figura 5), dependiendo de la aplicación exacta y el punto previsto de bloqueo.

Las micropartículas de poliestireno fueron o bien sintetizadas en el laboratorio o bien se compraron de Duke scientific como perlas de poliestireno-divinilbenceno de 40 μm fluorescentes verdes secadas. La síntesis de las micropartículas de poliestireno se llevó a cabo por la copolimerización en suspensión de estireno y dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), como se describe previamente en Ihara H et al. (Materials Chemistry and Physics. 2009;114(1):1-5) y Uchimura A, et al. (Materials Chemistry and Physics. 2011;129(3):871-80). Se creó una fase de aceite mezclando 2,5 ml de estireno (Aldrich), 2,5 ml de EGDMA (Aldrich) y 50 mg de azobisisobutironitrilo (AIBN; Aldrich). Entonces se añadió la fase aceitosa a 30 ml de poli(alcohol vinílico) acuoso al 4 % en peso (PVA, 87-90 % hidrolizado, peso molecular medio 30.000-70.000; Aldrich) en un matraz redondo. La mezcla se agitó a 250 rpm durante una hora a temperatura ambiente y luego se dejó reposar durante 24 horas a 60 °C. Las partículas se recogieron por centrifugación, se lavaron en ddH₂O dos veces, se resuspendieron en 30 ml de ddH₂O y se sometieron a reflujo durante la noche para retirar cualquier PVA restante. Entonces se recogieron las partículas por centrifugación, se lavaron con metanol dos veces y se secaron a vacío.

Producción de partículas de embolización

Se recubrieron cada una de las micropartículas de poliestireno sintetizadas en laboratorio y las micropartículas de poliestireno-divinilbenceno compradas con las partículas de titanio dopadas con gadolinio.

60 Se mezclaron las micropartículas con las nanopartículas en una relación 1:9 (v/v). Entonces se sinterizaron las nanopartículas de titanio sobre la superficie de las micropartículas de poliestireno calentando la mezcla hasta 230 °C que está por encima de la temperatura de transición vítrea de las micropartículas de poliestireno. Esto se hizo en un horno Carbolite RWF 1200 a una tasa de incremento de siete grados por minuto. La mezcla se mantuvo a 230 °C durante 15 minutos para limitar cualquier posible cambio en la fase cristalina en las partículas de titanio dopadas. Se separaron las micropartículas recubiertas con nanopartículas de titanio dopadas del exceso nanopartículas usando un gradiente de densidad de sacarosa que contenía 60 % y 15 % de sacarosa y centrifugando durante una hora a

9.000 rpm. Se extrajo la banda que contenía las micropartículas recubiertas, se centrifugó y se lavó en ddH₂O tres veces para retirar la sacarosa. Finalmente se secaron las partículas preparadas durante la noche a vacío.

Se usó TEM para medir el tamaño, morfología superficial y estructura cristalina de las partículas de titania dopadas con gadolinio. Se realizó TEM usando un microscopio JEOL JEM-2010 equipado con una pistola de electrones termiónico de LaB₆ que operaba a una energía de haces primarios de 200 keV y un sistema de análisis de rayos X Oxford Instruments INCA para llevar a cabo la espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDX). Analizando los rayos X característicos producidos por la interacción del haz primario de electrones con la muestra, se pudieron determinar los elementos presentes en la muestra. Se prepararon especímenes de TEM resuspendiendo las nanopartículas en etanol y depósito por goteo sobre rejillas recubiertas de carbono lleno de agujeros (Agar Scientific).

Se usó SEM para evaluar la distribución de tamaños y la cobertura superficial de las micropartículas recubiertas con nanopartículas (es decir, las partículas de embolización de la invención). Se realizó SEM usando un microscopio JEOL JSM-840F que operaba a una energía de haces primarios de 3 keV y se recogieron imágenes en modo de obtención de imágenes electrónicas secundarias. Se prepararon especímenes de SEM por espolvoreado sobre un portamuestras de SEM con cinta de carbono (Agar Scientific) y luego se recubrieron con una capa de platino de 3 nm para reducir la carga durante la operación.

Las imágenes de SEM de partículas de embolización según la invención se muestran en las Figuras 5 y 6. Las nanopartículas se pueden visualizar sobre la superficie de las micropartículas en la Figura 6, que muestra que las nanopartículas proporcionan un recubrimiento uniforme que no alteraría la capacidad de la micropartícula para embolizar la vasculatura.

Experimentos de muerte celular - Ejemplo 1

Se determinó *in vitro* la eficacia de las nanopartículas y las micropartículas recubiertas de nanopartículas usando una línea celular de rhabdomyosarcoma (RD). Se cultivaron células en medio de crecimiento (medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); Aldrich) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Aldrich), L-glutamina 2 mM (Aldrich), 100 U/ml de penicilina (Aldrich) y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Aldrich) y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Las células se sometieron a pases cada tres a cuatro días.

Se sembraron células de RD en dos placas separadas de 96 pocillos a 1×10^4 células por pocillo en 150 μ l de medio nuevo y se incubaron durante la noche para permitir que las células se adhirieran a la placa. Al día siguiente se trataron ambas placas de células, por triplicado, con: (i) 1,5 mg de partículas de titania sin dopar (1,5 mg de TiO₂); (ii) 1,5 mg de partículas de titania dopadas con gadolinio (1,5 mg de TiO₂:Gd); (iii) 15 mg de micropartículas recubiertas con partículas de titania sin dopar (15 mg de PS-TiO₂); (iv) 15 mg de micropartículas recubiertas con partículas de titania dopadas con gadolinio (15 mg de PS-TiO₂:Gd); o (v) solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control. Al día siguiente, se expuso una placa de células tratadas con partículas a un amplio espectro de energías de rayos X de hasta 150 keV con y energía promedio de desde 80 hasta 90 keV y una dosis de 3 Gray mientras que la otra placa se mantuvo sin irradiar como control (0 Gray). El día final del experimento, se determinó la proliferación celular por recuento manual de células usando un hemocitómetro. Se retiró el medio, las células se lavaron en PBS y se usaron 30 μ l de tripsina-EDTA para desprender las células adherentes. Después de confirmar que las células se habían desprendido, se añadieron 30 μ l de medio de crecimiento nuevo para neutralizar la tripsina y las células se contaron usando un microscopio óptico. Se dejó que las células se recuperaran durante la noche, y se evaluó la muerte celular por recuento manual de células (Figura 7).

El experimento muestra que las nanopartículas de titania tanto solas como combinadas con micropartículas no provocan la muerte celular, con o sin irradiación (Figura 6; 1,5 mg de TiO₂ y 15 mg de PS-TiO₂). Las partículas dopadas con gadolinio son inertes en ausencia de irradiación, pero muestran muerte celular espectacularmente incrementada después de la irradiación.

Se ha mostrado, por tanto, que las partículas de embolización pueden ser funcionalizadas con nanopartículas dopadas para producir partículas que pueden tanto embolizar un sitio de cáncer o tumor como provocar la muerte celular tras la exposición a radiación de rayos X.

Experimento de muerte celular - Ejemplo 2

Cultivo celular

Se determinó *in vitro* la eficacia de las nanopartículas y las micropartículas recubiertas de nanopartículas en líneas de células cancerosas inmortalizadas obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas; VA): Líneas de rhabdomyosarcoma, RD (ATCC código CCL-136) y RH30 (ATCC código CRL-7763), y la línea de cáncer de cuello uterino HeLa (ATCC código CCL-2). Las células se cultivaron en medio de crecimiento (medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); Aldrich) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Aldrich), L-glutamina 2 mM (Aldrich), 100 U/ml de penicilina (Aldrich) y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Aldrich) y se incubaron a 37 °C en

una atmósfera de 5 % de CO₂. Las células se sometieron a pases cada tres a cuatro días.

Ensayo clonogénico

5 Se sembraron matraces de células HeLa y las células se incubaron durante 4 horas para permitir la unión. Se añadieron nanopartículas a los matraces apropiados y se incubaron durante la noche antes de la irradiación. Tras la irradiación, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Entonces se tripsinaron las células, se contaron y las placas de Petri se sembraron con 1000 células/ placa. Se sembraron al menos tres placas de Petri para cada condición experimental. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ sin alterar durante 2
10 semanas. Entonces se tiñeron las células lavando dos veces con PBS, se fijaron usando glutaraldehído durante 30 minutos antes de añadir 0,5 % de tinción de cristal violeta durante al menos 1 hora y posteriormente se contaron las colonias supervivientes (>50 células). Entonces se calculó la fracción superviviente dividiendo las colonias contadas entre el número de células sembradas y corrigiendo para la eficiencia de siembra determinada usando el control de 0 Gy.

15 *Proliferación celular después de la incubación con micropartículas de embolización radiosensibilizantes*

Se sembraron células de RD en dos placas separadas de 96 pocillos a 1×10^4 células por pocillo en 150 µl de medio nuevo y se incubaron durante la noche para permitir que las células se adhirieran a la placa. Al día siguiente se prepararon placas por triplicado para ambos tipos de células y se trataron con o bien (i) 1,5 mg de partículas de titania sin dopar, (ii) 1,5 mg de partículas de titania dopadas con gadolinio, (iii) 15 mg de microesferas recubiertas con partículas de titania sin dopar, (iv) 15 mg de microesferas recubiertas con partículas de titania dopadas con gadolinio (v) PBS como control. Al día siguiente, se expuso una placa de células tratadas con partículas a 3 Gy de rayos X mientras que la otra placa se mantuvo sin irradiar como control. Después de 24 horas adicionales, se determinó la proliferación celular por recuento manual de células usando un hemocitómetro tras la retirada de las células adherentes usando tripsina-EDTA.

Hipoxia

30 *Puesta a punto experimental para irradiación bajo hipoxia*

Se realizaron experimentos de hipoxia para evaluar la proliferación celular usando una concentración de oxígeno de 0,2 % en nitrógeno y 5 % de dióxido de carbono. Dos horas antes de la irradiación, las células se movieron a una cámara de hipoxia que se lavó con gas de la composición anterior situada sobre un estante de acero inoxidable de 1 mm de espesor por encima del equipo de rayos X. En la cámara, las células se mantuvieron a 37 °C disponiendo los matraces encima de una placa de aluminio de 5 mm de espesor calentada por agua caliente circulante alrededor del exterior de la placa. Tras la irradiación, las células se transfirieron a una estufa de incubación donde se mantuvo la hipoxia. Se evaluó el número de células vivas por recuento manual de células después de 24 horas adicionales.

40 *Irradiaciones*

Se realizaron exposiciones a rayos X con rayos X de 250 kV (potencial constante) con filtro de cobre de 0,25 mm de espesor (capa de medio valor de 1,08 mm de Cu) a una tasa de dosis de 0,57 Gy/min medida usando una película GAFchromic de EBT3 calibrada (International Speciality Products, Wayne, NJ, EE.UU.). Todas las dosis citadas en el documento se refieren a dosis con respecto al agua, con muestras con y sin nanopartículas expuestas durante la misma cantidad de tiempo.

Producción de partículas radiopacas de óxido de tántalo

50 Se prepararon nanopartículas de TaOx usando el siguiente método. Se creó una fase de aceite mezclando 2,3 g de Igepal Co-520 (Aldrich), 0,75 ml de etanol (Fisher) y 20 ml de ciclohexano (Aldrich) agitando. Entonces se creó una microemulsión añadiendo 250 µl de NaOH 2 mM (ac). Finalmente, se añadieron 50 µl de etóxido de tántalo (V) (Aldrich) a la microemulsión a temperatura ambiente y se incubó durante 5 minutos. Entonces se añadió etanol (Fisher) a la mezcla para permitir que las partículas sedimentaran. Entonces se recogieron las partículas por centrifugación, se lavaron en etanol tres veces y se secaron en un desecador durante la noche.

Incorporación de nanopartículas de óxido de tántalo en micropartículas

60 Se prepararon micropartículas de poliestireno-TaOx por una modificación del método presentado por Ihara et al. (Materials Chemistry and Physics. 2009; 114(1): 1-5) para la síntesis de micropartículas de poliestireno. En primer lugar, se mezclaron 2,5 ml de estireno (Aldrich), 2,5 ml de EGDMA (Aldrich) y 50 mg de azobisisobutironitrilo (AIBN; Aldrich) para crear una fase aceitosa. Se mezclaron diferentes masas de nanopartículas de TaOx en la fase aceitosa para crear micropartículas de PS-TaOx que contenían teóricamente 0 % en peso, 5 % en peso, 10 % en peso, 20 % en peso y 50 % en peso de nanopartículas de TaOx. Entonces se sonicó la fase aceitosa usando una sonda ultrasónica (Sonic Vibra-Cell) durante un minuto (104 W, pulsos de 5 segundos con intervalos de 5 segundos) para aumentar la dispersión de las nanopartículas a través de la fase aceitosa. Se añadió la fase aceitosa a 30 ml de una

fase acuosa que contenía 4 % en peso de poli(alcohol vinílico) (PVA) (87-90 % hidrolizado, peso molecular medio 30.000-70.000; Aldrich) en un matraz redondo. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente y entonces se dejó reposar durante 24 horas a 60 °C. Se recogieron las partículas por centrifugación, se lavaron dos veces en ddH₂O, luego se resuspendieron en 30 ml de ddH₂O y se sometieron a reflujo durante la noche para retirar cualquier PVA restante. Las partículas se recogieron finalmente por centrifugación, se lavaron dos veces con metanol y se secaron a vacío.

Resultados

Nanopartículas de titanía dopadas

Vía de síntesis por pirólisis por pulverización de llama

Se pueden preparar las partículas de titanía dopadas por el proceso de sol-gel descrito anteriormente. También se usó un método de FSP alternativo que tenía el beneficio de ser más adecuado para la producción a gran escala de las nanopartículas para aplicaciones clínicas. La síntesis por FSP es una técnica prometedora para la síntesis rápida y escalable de nanopartículas. Se disuelven/dispersan precursores en un disolvente altamente exotérmico y se queman en una llama. Se usa comúnmente en la industria ya que se pueden preparar grandes cantidades de producto con subproducto no acuoso. El mecanismo de formación de partículas se basa en un principio de gas con respecto a materia y se puede dividir en cuatro etapas principales: (i) evaporación/descomposición por pulverización de precursores formando vapor metálico, (ii) nucleación como resultado de supersaturación, (iii) crecimiento por coalescencia y sinterización, y (iv) agregación/aglomeración de partículas.

Se prepararon por este método una serie de nanopartículas de Gd-TiO₂ dopadas y los resultados presentados aquí son para la muestra dopada con 5 % de átomos de gadolinio. Se llevaron a cabo análisis de TEM, EDX y XRD en las nanopartículas sintetizadas. Las imágenes de TEM muestran que las nanopartículas son de naturaleza esférica, con un tamaño de partículas de 5 – 20 nm. El análisis de XRD reveló la presencia de tanto las fases anatasa y rutilo con un tamaño de cristalitas de aproximadamente 6-8 nm para anatasa y 10-12 nm para rutilo. No es discernible fase cristalina adicional distinta de rutilo y anatasa aunque todavía pueden estar presentes otras fases de Gd (la resolución del difractómetro puede ser demasiado baja para detectar cualquier pico a concentraciones tan pequeñas). Además, no se detectó desplazamiento significativo en los picos de anatasa o rutilo, como cabría esperar cuando se consideran los tamaños catiónicos en una coordinación de [6] veces de la tierra rara ($r_{\text{Gd}^{3+}} = 0,938\text{\AA}$ en comparación con $r_{\text{Ti}^{4+}} = 0,605\text{\AA}$). Se encontró que la calcinación en horno en aire a 500 °C con la finalidad de retirar cualquier residuo de carbono no cambió el tamaño de partículas y la relación rutilo/anatasa. Según las imágenes de HAADF, el Gd está presente en la superficie de las nanopartículas, aunque la resolución es limitada. El espectro de XPS de la muestra dopada con 5 % coincide con esta suposición, ya que muestra la presencia de Gd. Los resultados de ICP-MS mostraron que el contenido de Gd de FSP produjo materiales bien correlacionados con NPs con contenido teórico de Gd de 10,4 % en peso de Gd 48,4 % en peso de Ti.

Integridad de nanopartículas

Puesto que el gadolinio libre tiene el potencial de ser tóxico en pacientes, se probó si cualquier gadolinio libre era liberado de la superficie de las nanopartículas. Se incubaron nanopartículas en agua durante un periodo de 14 días y se evaluó la solución de sumidero para gadolinio libre a los 1, 5, 6, 8 y 14 días. Se usó nitrato de gadolinio (III) hexahidratado como control positivo en el ensayo debido a su solubilidad. Usando el ensayo de Arsenazo, no se detectó gadolinio de la solución de sumidero recogida de muestras que contenían las nanopartículas. Debido a los límites de detección del ensayo de Arsenazo, también se analizaron las mismas muestras de sumidero por ICP-MS. Aquí, el límite de detección es <0,01 ppm, pero nuevamente no se detectó gadolinio, que indica que las estructuras de nanopartículas no cambian por la incubación en solución acuosa y que las nanopartículas mantienen su integridad.

Propiedades radiosensibilizantes de las nanopartículas

Se verificó la capacidad de las nanopartículas para actuar de radiosensibilizadores usando el ensayo clonogénico. Se usó la línea celular HeLa puesto que las líneas celulares RD y RH30 experimentales de los presentes inventores no forman bien colonias. La variación en la fracción superviviente (determinada a partir de colonias contadas y corregidas para la eficiencia de siembra, PE) en función de la dosis y el tratamiento de nanopartículas se muestra en la Figura 8. En ausencia de irradiación, no hubo diferencia significativa entre los controles ($PE_{\text{con}} = 0,88 \pm 0,10$) y o bien la titanía sin dopar ($PE_{\text{sin dopar}} = 0,72 \pm 0,04$) o dopada ($PE_{\text{dopada}} = 0,90 \pm 0,009$). Después de la irradiación con 3 Gy no hubo diferencia significativa entre el número de colonias observadas en la muestra sin nanopartículas y las incubadas con nanopartículas de titanía. Sin embargo, se puede observar que hubo una diferencia altamente significativa ($p \leq 0,05$) entre muestras incubadas sin nanopartículas en comparación con las incubadas con partículas de titanía dopadas. Esto confirma que las partículas de titanía dopadas preparadas por FSP son capaces de radiosensibilizar de un modo similar a las preparadas por sol-gel y, por tanto, proporciona una metodología para la producción a gran escala de estas nanopartículas para prueba radiobiológica y uso clínico.

Radiosensibilización en condiciones hipóxicas

Para investigar más la capacidad de las partículas para actuar de radiosensibilizadores en condiciones clínicamente relevantes, se introdujeron nanopartículas en células bajo hipoxia verdadera con las células incubadas e irradiadas en condiciones de oxígeno reducido.

Hipoxia

Mientras que los agentes miméticos de hipoxia pueden activar la vía de señalización similar en células similares a las observadas como resultado de hipoxia, no previene que el oxígeno presente en la célula modifique directamente el daño de ADN inducido por radiación, que se cree que es el mecanismo dominante para el efecto del oxígeno. Por tanto, también fue importante investigar la acción de las partículas en células cultivadas en condiciones de oxígeno reducido. Los datos de proliferación experimental para células RH30 cultivadas en ausencia de nanopartículas realizada en condiciones hipóxicas no mostró diferencia significativa en el número de células tras una exposición de 5 Gy en comparación con un control sin irradiar (Figura 9). Similarmente, también se observaron cifras de células cuando las células se incubaron con el control estándar (P25@Si) y nanopartículas de TiO₂@Si preparadas por FSP cuando se expusieron a o bien 5 Gy de irradiación o no se irradiaron. En cambio, mientras que las células incubadas con las nanopartículas de radiosensibilizador TiO₂@Gd@Si no muestran diferencia en ausencia de radiación (como era de esperar), después de la irradiación se observó una disminución significativa de 29 % ($p \leq 0,05$) en la cifra de células.

Incorporación de nanopartículas de TiO₂: Gd en micropartículas de embolización*Recubrimiento de nanopartículas de micropartículas de poliestireno*

Las micropartículas de poliestireno fueron o bien preparadas en el laboratorio, o bien se usaron patrones comerciales, en un intervalo de tamaños. Se varió el tamaño de las partículas de embolización puesto que habrá un intervalo en el diámetro de los vasos que suministran sangre al tumor.

Se recubrieron las partículas de embolización blandas con o bien nanopartículas de titanía de control o partículas de titanía dopadas. Se investigaron varios métodos, pero se encontró que el más satisfactorio era la sinterización de las nanopartículas de titanía sobre el poliestireno, como se muestra en la Figura 10. Se evaluó el recubrimiento de las micropartículas con nanopartículas por SEM.

Propiedades de radiosensibilización de partículas de embolización

Se probó la radiosensibilización de partículas de embolización recubiertas de titanía en cultivo celular usando un ensayo de proliferación. Se puede observar que en las muestras de control sin irradiar, ni las nanopartículas de titanía solas ni las micropartículas de poliestireno recubiertas con nanopartículas de titanía fueron capaces de afectar significativamente la cifra de células (Figura 11). Igualmente, las partículas de titanía dopadas con gadolinio no afectaron significativamente el número de células en los controles sin irradiar. En cambio, se confirmó que tanto las nanopartículas dopadas con gadolinio como las micropartículas recubiertas con las partículas de titanía dopadas con gadolinio fueron capaces de producir una reducción significativa en el número de células tras la irradiación (en comparación con las nanopartículas sin dopar donde no se observó diferencia significativa). Por tanto, cabría esperar que las micropartículas de embolización recubiertas con partículas de titanía dopadas con gadolinio actuaran de radiosensibilizadores, además de actuar como bloqueo físico de nutrientes y oxígeno para el tumor.

Discusión***Síntesis y caracterización de nanopartículas***

En el presente documento se describe: un método escalable para la producción de partículas de titanía dopadas radiosensibilizantes; demostración de la integridad de las nanopartículas; investigación de su eficacia en condiciones hipóxicas, y demostración de la utilidad adicional como un componente de micropartículas de embolización.

En el presente documento se describe el uso de FSP para generar las nanopartículas. Los polvos tienen tamaños medios de partículas (APS) de 15-100 nm con áreas superficiales específicas de 30-100 m²/g. Se pueden usar la tecnología de FSP para producir fácilmente óxidos metálicos mixtos e individuales a partir de materiales de partida de bajo coste en una única etapa. Se obtienen distribuciones uniformes del tamaño de partículas ya que es un proceso en fase vapor. Los carboxilatos o alcóxidos metálicos se usan frecuentemente como precursores y así se encontrarían impurezas metálicas limitadas u otra contaminación no deseada tales como haluros en el producto final. Finalmente, se ha mostrado que el proceso es escalable y los productos ya están comercialmente disponibles.

Se mostró que las nanopartículas sintetizadas aquí tuvieron entre 7,9 y 11,7 nm de diámetro, siendo las partículas de anatasa más pequeñas que las partículas de rutilo, y se confirmó la presencia del dopante gadolinio por EDX. Se confirmó posteriormente que las nanopartículas dopadas con gadolinio preparadas por FSP actuaban de

radiosensibilizadores en cultivo celular, mostrando una gran reducción en tanto la supervivencia clonogénica (Figura 8) como la proliferación celular (Figura 9). Se realizaron más pruebas para garantizar que no hubo rotura de la estructura y la liberación consecuente del componente de tierras raras. Esto fue importante puesto que el gadolinio en su estado no unido es extremadamente tóxico y es un potente inhibidor de los canales de calcio y tiene significativa toxicidad cardiovascular y neurológica. Se conoce que el gadolinio se acumula en el hígado, hueso y los ganglios linfáticos; y en ratones la mediana de la dosis letal (LD50) de $GdCl_3$ es solo 100-200 mg/kg. Sin embargo, el gadolinio en su forma quelada se usa comúnmente para mejorar el contraste de tejidos en IRM y se ha demostrado que es seguro en pacientes con función renal normal. Los datos mostraron que no hubo liberación del gadolinio de las nanopartículas usando ya fuera el ensayo de Arsenazo recomendado por el Laboratorio de Caracterización Nacional (USA) o por ICP-MS. Investigaciones adicionales por PIXE confirman que la integridad estructural de las nanopartículas ha mostrado pruebas adicionales de que no existe liberación de elementos de las tierras raras.

Eficacia de nanopartículas bajo hipoxia

Aunque se ha demostrado que las nanopartículas actúan de radiosensibilizadores en condiciones normóxicas, las células tumorales son frecuentemente hipóxicas o anóxicas. La hipoxia es uno de los parámetros más importantes que provocan la potenciada agresividad tumoral y resistencia al tratamiento. Esto es debido a que el oxígeno molecular es un potente radiosensibilizador. Sin embargo, esta radiosensibilización no resulta de efectos metabólicos o fisiológicos del oxígeno, pero refleja el hecho de que el oxígeno es una molécula con extrema afinidad electrónica que participa en la reacción química que conduce a la producción de daño al ADN después de la absorción de energía de la radiación ionizante. La privación de oxígeno puede, por tanto, dar como resultado una reducción significativa en la eficiencia de la radioterapia. Como tal, sería pertinente evaluar la eficacia de las nanopartículas en condiciones de oxígeno reducido.

Se investigó la acción de las nanopartículas bajo hipoxia verdadera. Durante la radioterapia habrá efectos sobre la proliferación y progresión del ciclo celular, pero el efecto dominante del oxígeno es la modificación del daño al ADN inducido por radiación que disminuye su capacidad de reparación, y por tanto bajas concentraciones de oxígeno pueden dar como resultado una disminución en la eficiencia de radiación en células inactivantes. Durante los experimentos, las células se preincubaron en condiciones hipóxicas y el periodo de experimento y recuperación también se sometieron a las mismas condiciones de oxígeno. Aunque se ha demostrado que el efecto dominante del oxígeno sobre la radiosensibilidad requiere que esté presente durante o en el plazo de ms desde la irradiación, sin embargo, es probable que la respuesta global se module hasta cierto grado por la presencia o ausencia de oxígeno que afecta la respuesta de una célula al daño inducido por radiación y los niveles de fondo de daño provocado por estrés oxidativo. Se ha mostrado que la hipoxia post-irradiación elimina la recuperación de daño potencialmente letal (PLDR) en células irradiadas bajo hipoxia. Sin embargo, cuando se volvió a condiciones euóxicas, se alivió la inhibición de PLDR por hipoxia.

Aquí se mostró que la irradiación no dio como resultado ninguna reducción significativa en los números de células en células incubadas con ninguno de los controles de nanopartículas de titanía. Sin embargo, las partículas de titanía dopadas con gadolinio todavía mostraron un aumento significativo en la muerte celular tras la irradiación. Esto indica que las partículas de titanía dopadas serían eficaces como radiosensibilizadores incluso en las condiciones hipóxicas observadas en células tumorales.

Síntesis de partícula de embolización de material compuesto

Para añadir a la utilidad de las partículas de titanía dopadas, se preparó una micropartícula de embolización de material compuesto en la que la superficie de micropartículas de poliestireno embólicas blandas se recubrieron con las nanopartículas de radiosensibilizador. Para lograr la buena cobertura de las micropartículas, se intentaron varios métodos para la unión de las nanopartículas. El primer método fue un método de un solo paso que usó metacriloxipropiltrimetoxisilano (MS) para anclar la titanía sobre la superficie de las esferas de poliestireno durante el transcurso de la reacción de polimerización de micropartículas. Sin embargo, durante la reacción de síntesis se encontró que el recubrimiento de MS inhibió la fotoactividad UV de las nanopartículas de radiosensibilizador de titanía, y por extrapolación la capacidad para generar ROS por excitación de rayos X. Un segundo método usó el polielectrolito positivamente cargado PDADMAC para unir electrostáticamente las nanopartículas de titanía sobre la superficie de esferas de poliestireno previamente preparadas. Podría obtenerse una cobertura razonable, pero hubo el problema de que las nanopartículas de titanía podrían desprenderse de las esferas de poliestireno y liberarse dentro del cuerpo. En el contexto de las nanopartículas de los presentes inventores, las enzimas en la corriente sanguínea podrían provocar posiblemente la degradación del electrolito PDADMAC y liberar las nanopartículas de titanía de la superficie de partículas embólicas.

El método final y más satisfactorio de producción de partículas de PS-titanía hizo uso de un método de sinterización. Se suspendieron esferas de poliestireno previamente preparadas en un baño de titanía y luego se calentaron hasta ≥ 165 °C; la temperatura de transición vítrea de las esferas de poliestireno. La sinterización de la mezcla de poliestireno-titanía a 165 °C produjo aproximadamente 70 % de cobertura de micropartículas con la nanopartícula de titanía, mientras que el aumento de la temperatura de sinterización hasta tanto 200 °C como 230 °C aumentó la cobertura hasta casi 100 %. Fue importante mantener la temperatura de sinterización por debajo de 260 °C, punto

5 en el que el poliestireno empieza a degradarse como se indica por una disminución en la masa. También fue deseable mantener el tiempo de calentamiento a la llama y la temperatura a un mínimo, puesto que la estructura cristalina de las nanopartículas de titania puede ser adversamente afectada (como control, se trataron nanopartículas no unidas en el mismo procedimiento de sinterización, y se mostró que no hubo diferencia significativa ($p \geq 0,05$) en la actividad antes y después de la sinterización.) Se probó *in vitro* la capacidad de las partículas de titania dopadas y las partículas embólicas de PS-titania para inhibir la proliferación celular en la línea celular de RD. Hubo una disminución muy significativa de $56,9 \% \pm 11,4$ ($p \leq 0,005$) en el número de células vivas para las células tratadas con las nanopartículas de radiosensibilizador de $TiO_2:5 \%$ de Gd, en comparación con las células de control (que no se incubaron con nanopartículas) pero recibieron la misma dosis de irradiación. También 10 hubo una diferencia muy significativa en el número de células supervivientes entre células incubadas con el radiosensibilizador de $TiO_2:5 \%$ de Gd y o bien sin irradiar o irradiadas con 3 Gy.

15 Esta es la primera vez que se ha demostrado que una partícula embólica radiosensibilizante es inerte sin radiación pero que se puede activar usando rayos X para potenciar la destrucción celular. Las partículas de embolización radiosensibilizadoras mostradas en el presente documento son una prueba de concepto y se pueden modificar adicionalmente para mayor utilidad. Se pueden alterar con facilidad el intervalo de tamaños de los vasos tumorales y el tamaño de la partícula de embolización blanda para proporcionar el máximo tamaño para oclusión del vaso. Además, se pueden crear partículas de embolización multimodales mediante la adición de marcadores fluorescentes o agentes de contraste de IRM al centro de las micropartículas, además de la modificación de la superficie para 20 generar un radiosensibilizador. Las micropartículas también pueden incorporar agentes de obtención de imágenes tales como fluoróforos o metales pesados tales como tántalo como agentes de contraste de rayos X (no magnéticos, así se permite al paciente someterse a IRM), o combinación con quimioembolización (una mezcla de nanopartículas de sílice mesoporosa y nanopartículas de titania).

25 **Listado de secuencias**

- <110> Isis Innovation Limited
- <120> PARTÍCULA DE EMBOLIZACIÓN
- 30 <130> N404551WO
- <140> PCT/GB2016/051059
- <141> 15-04-2016
- 35 <150> GB 1506381.1
- <151> 15-04-2015
- <160> 2
- 40 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 8
- 45 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido señal de localización nuclear (NLS)
- 50 <400> 1

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

- 55 <210> 2
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
- <223> Péptido señal de localización nuclear (NLS)
- <400> 2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula de embolización que comprende una micropartícula recubierta con una pluralidad de nanopartículas, nanopartículas que comprenden un óxido metálico dopado con uno o más elementos de las tierras raras, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio, óxido de cinc o dióxido de cerio.
2. Una partícula de embolización según la reivindicación 1, en donde el óxido metálico es dióxido de titanio.
- 10 3. Una partícula de embolización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el uno o más elementos de las tierras raras se seleccionan de Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm e Yb, preferentemente en donde el uno o más elementos de las tierras raras se seleccionan de Gd, Eu, Er y Nd, más preferentemente en donde el elemento de las tierras raras es Gd, y opcionalmente en donde el óxido metálico se dopa con el uno o más elementos de las tierras raras en una cantidad total de desde 0,1 hasta 25 % en moles con respecto a la cantidad de óxido metálico.
- 15 4. Una partícula de embolización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- 20 las nanopartículas tienen un diámetro promedio inferior a 200 nm; y/o la micropartícula tiene un diámetro de desde 1 hasta 500 µm o de desde 10 hasta 200 µm.
- 25 5. Una partícula de embolización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la micropartícula comprende uno o más materiales seleccionados de un polímero, un metal y un compuesto inorgánico, preferentemente en donde la micropartícula comprende uno o más polímeros o copolímeros seleccionados de polialquenos, poliacrilatos, poliésteres y poliéter, polímero o copolímero que opcionalmente está reticulado, más preferentemente en donde la micropartícula comprende un polímero o copolímero formado de unidades de monómero de estireno.
- 30 6. Una partícula de embolización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la partícula de embolización comprende además una pluralidad de nanopartículas radiopacas, y opcionalmente en donde:
- 35 las nanopartículas radiopacas se incorporan en la micropartícula; y/o las nanopartículas radiopacas comprenden óxido de tantalio, oro, o sulfuro de bismuto (III).
- 40 7. Una partícula de embolización según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la partícula de embolización comprende además un agente quimioterapéutico, preferentemente en donde la partícula de embolización comprende además una pluralidad de nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico, más preferentemente:
- 45 en donde las nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico se recubren sobre la superficie de la micropartícula; y/o en donde las nanopartículas que comprenden el agente quimioterapéutico son nanopartículas de sílice.
8. Una composición que comprende una pluralidad de partículas de embolización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
9. Una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de partículas de embolización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y uno o más excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 50 10. Una partícula de embolización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una composición como se define en la reivindicación 8 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones.
- 55 11. Una partícula de embolización, una composición o una composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde:
- 60 el cáncer es cáncer de pulmón, hígado, riñón, vejiga, mama, cabeza y cuello, cerebro, ovario, próstata, intestino, colon, recto, útero, páncreas, ojo, médula ósea, sistema linfático o glándula tiroideas; y/o el cáncer está asociado con tejido tumoral que comprende células tumorales hipóxicas.
- 65 12. Una composición o una composición farmacéutica según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones comprende:
- a) administrar por vía parenteral la composición o la composición farmacéutica a un sujeto que se va a tratar; y b) dirigir radiación de rayos X o radiación por haces de protones a un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral,

opcionalmente en donde el tratamiento de cáncer en combinación con radiación de rayos X o radiación por haces de protones comprende:

5 a) administrar la composición o la composición farmacéutica a un sujeto que se va a tratar;

ai) dejar que las partículas de embolización se acumulen en un lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral y embolizar la vasculatura dentro del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral;

10 aii) opcionalmente detectar la presencia de las partículas de embolización en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral; y

b) dirigir radiación de rayos X o radiación por haces de protones al lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral y así excitar el óxido metálico en las nanopartículas para generar especies reactivas de oxígeno en el lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

15 13. Una composición o una composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso como se define en dicha reivindicación, en donde: la energía de la radiación de rayos X es superior o igual a 0,05 MeV; y/o

(a) comprende administrar por vía intravenosa la composición o la composición farmacéutica al sujeto que se va a tratar, preferentemente en una localización en o antes del lugar o sitio del cáncer o tejido tumoral.

20 14. Una partícula de embolización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición como se define en la reivindicación 8 para su uso en un método de embolización.

25 15. Un proceso de producción de una partícula de embolización como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, cuyo proceso comprende:

(i) proporcionar una micropartícula;

(ii) poner en contacto la micropartícula con una pluralidad de las nanopartículas; y

(iii) calentar la micropartícula y las nanopartículas para formar la partícula de embolización,

30 preferentemente en donde:

la micropartícula comprende un polímero y (iii) comprende calentar la micropartícula y las nanopartículas a una temperatura que está por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero; y/o

35 (iii) comprende calentar la micropartícula y las nanopartículas a una temperatura de desde 150 °C hasta 300 °C; y/o

el proceso comprende además producir dicha pluralidad de nanopartículas por un proceso que comprende pirólisis por pulverización de llama.

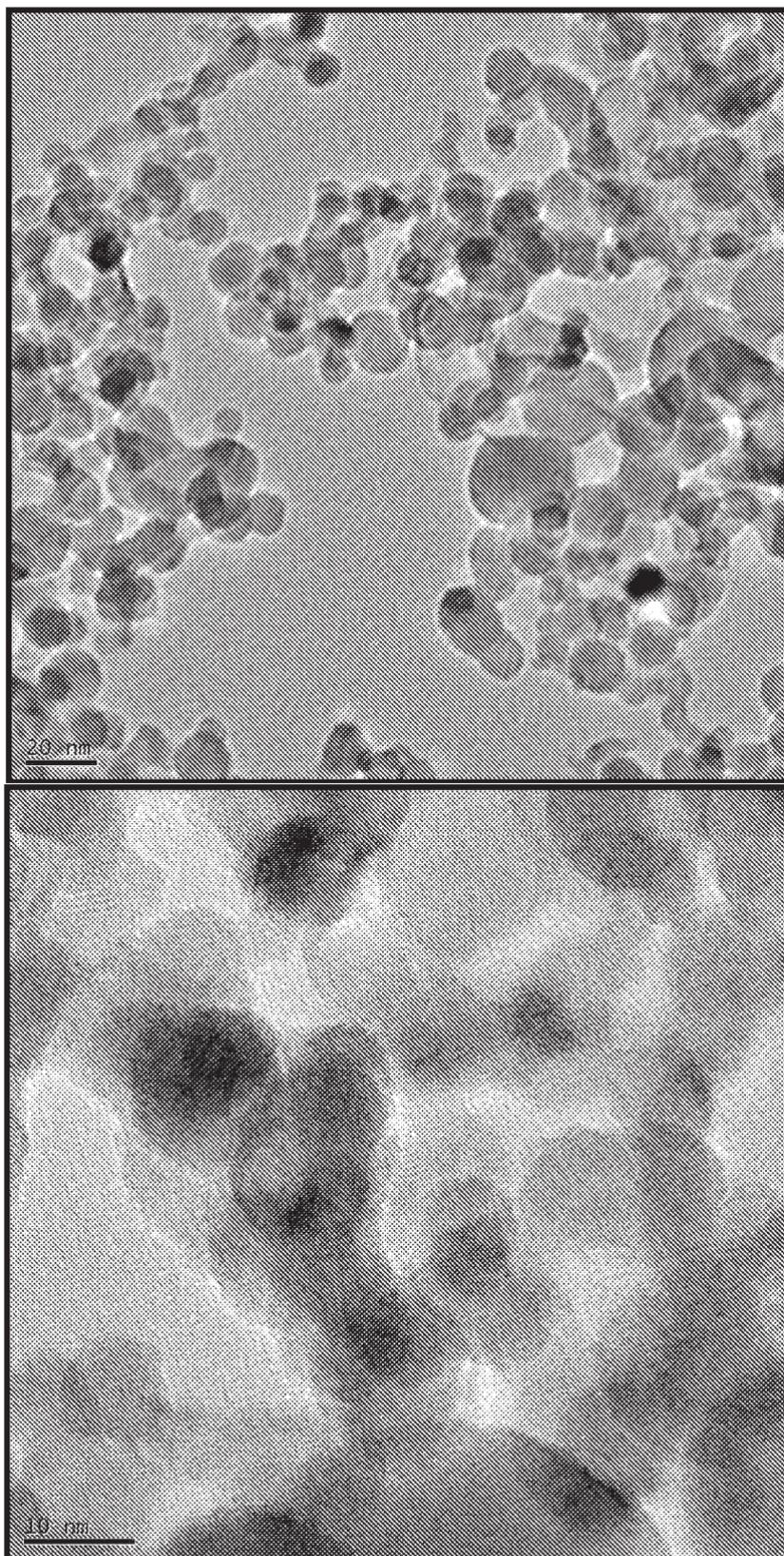


Figura 1

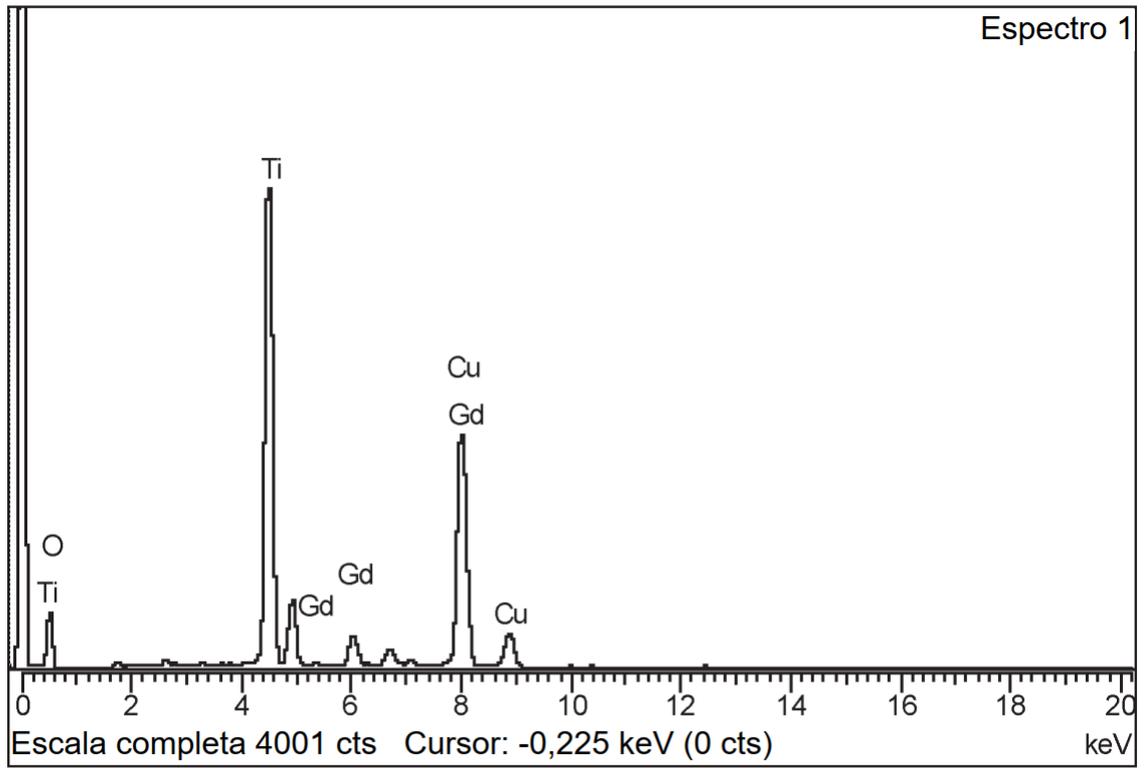


Figura 2

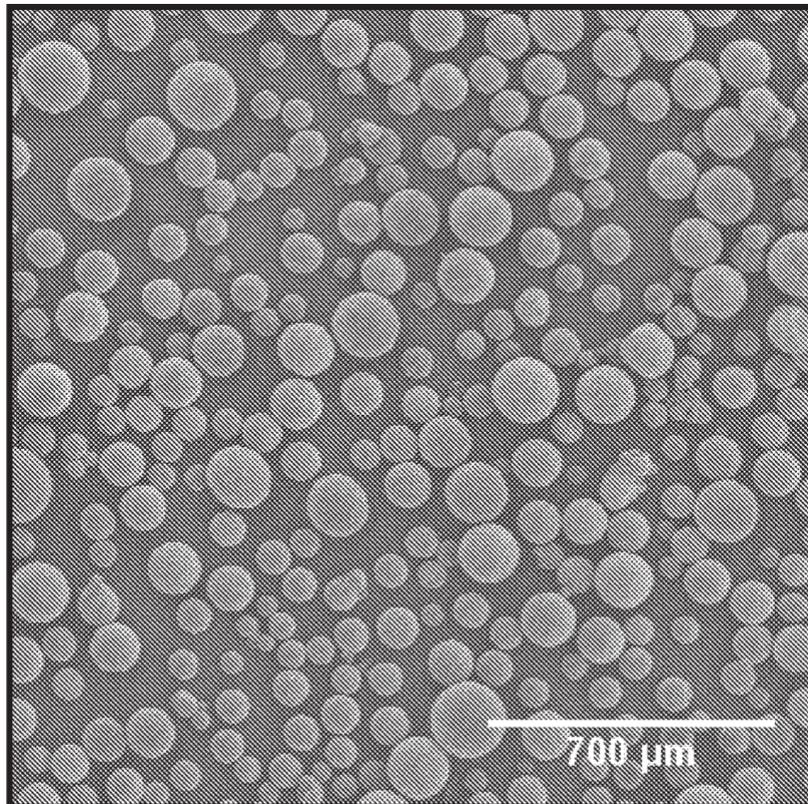


Figura 3

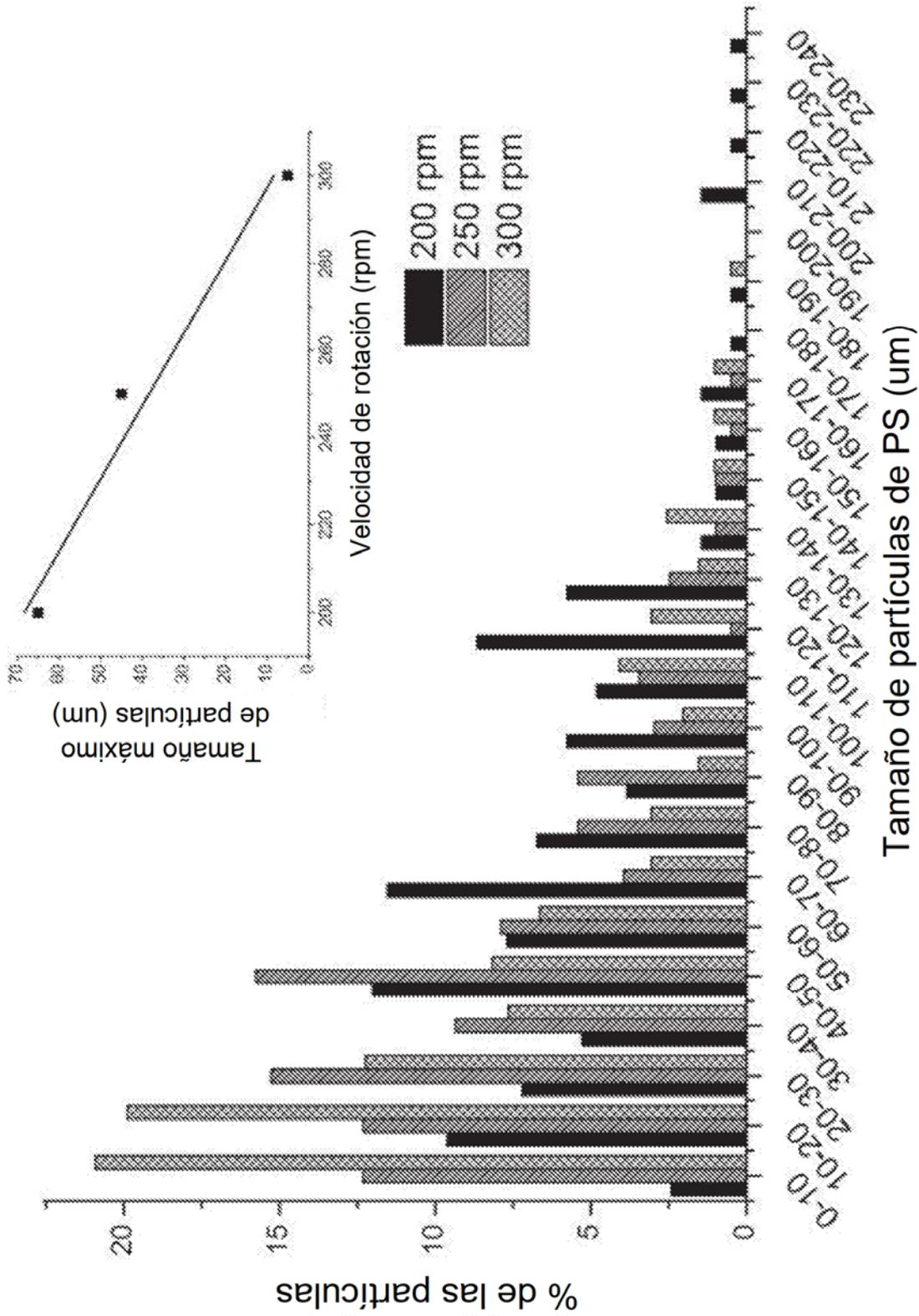


Figura 4

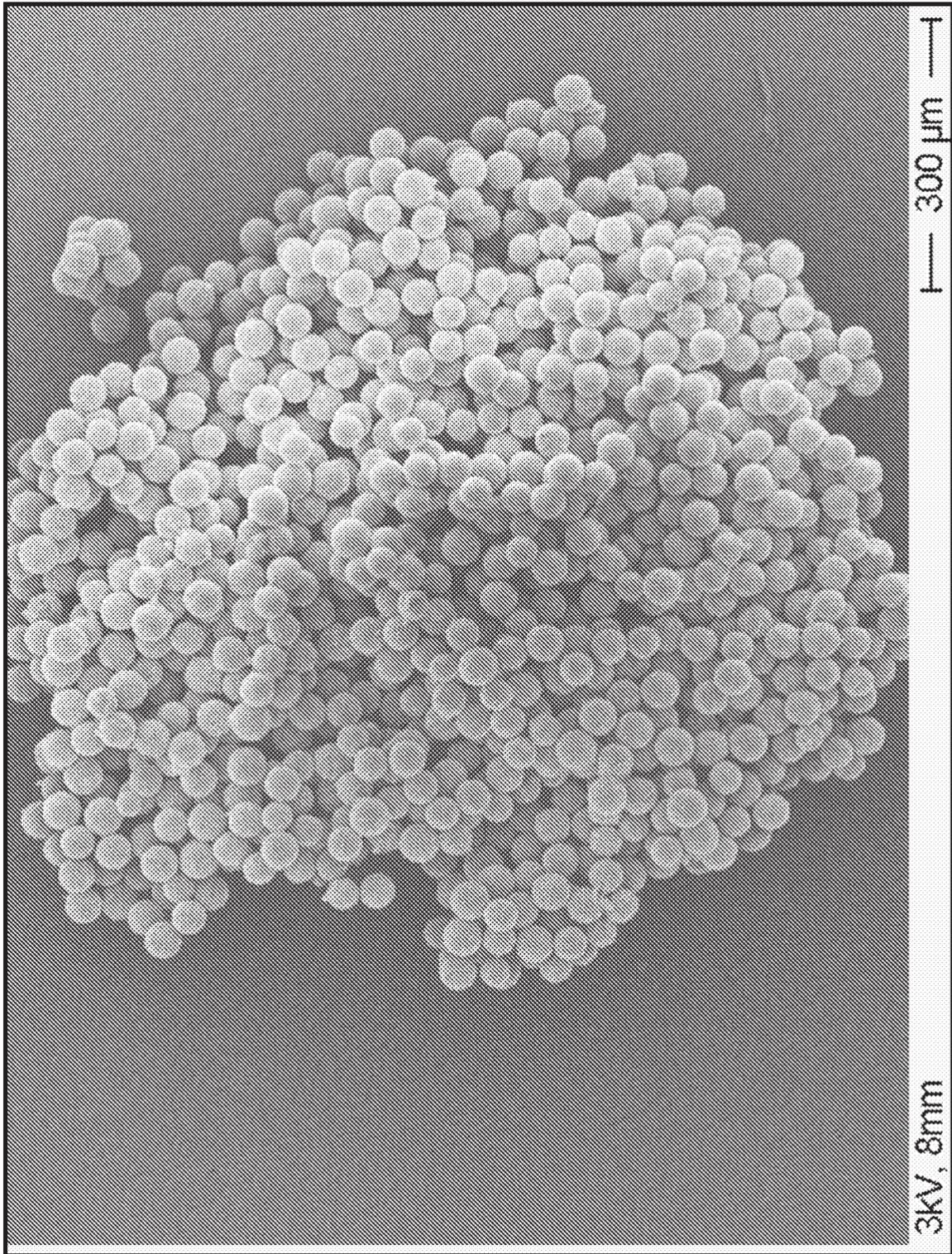


Figura 5

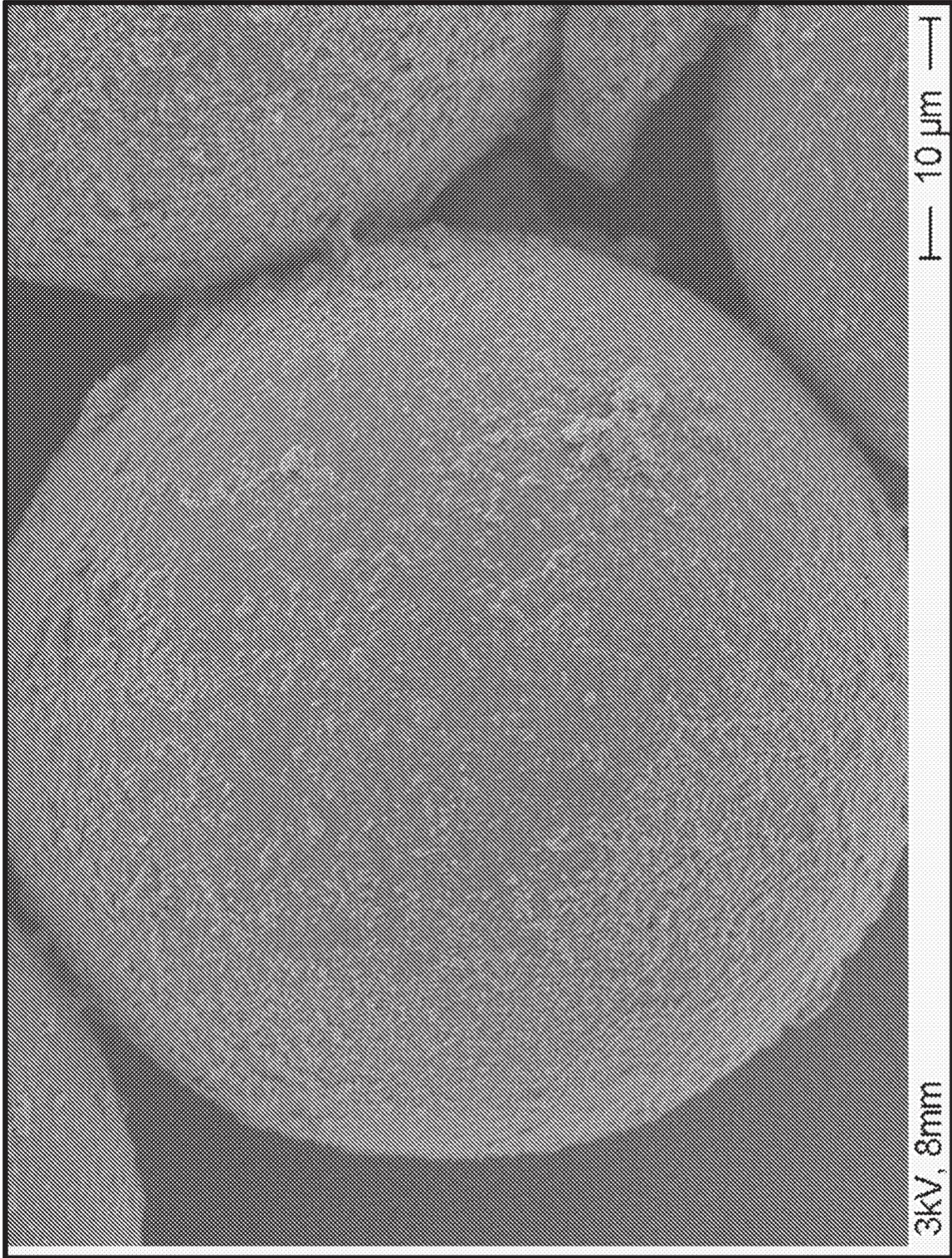


Figura 6

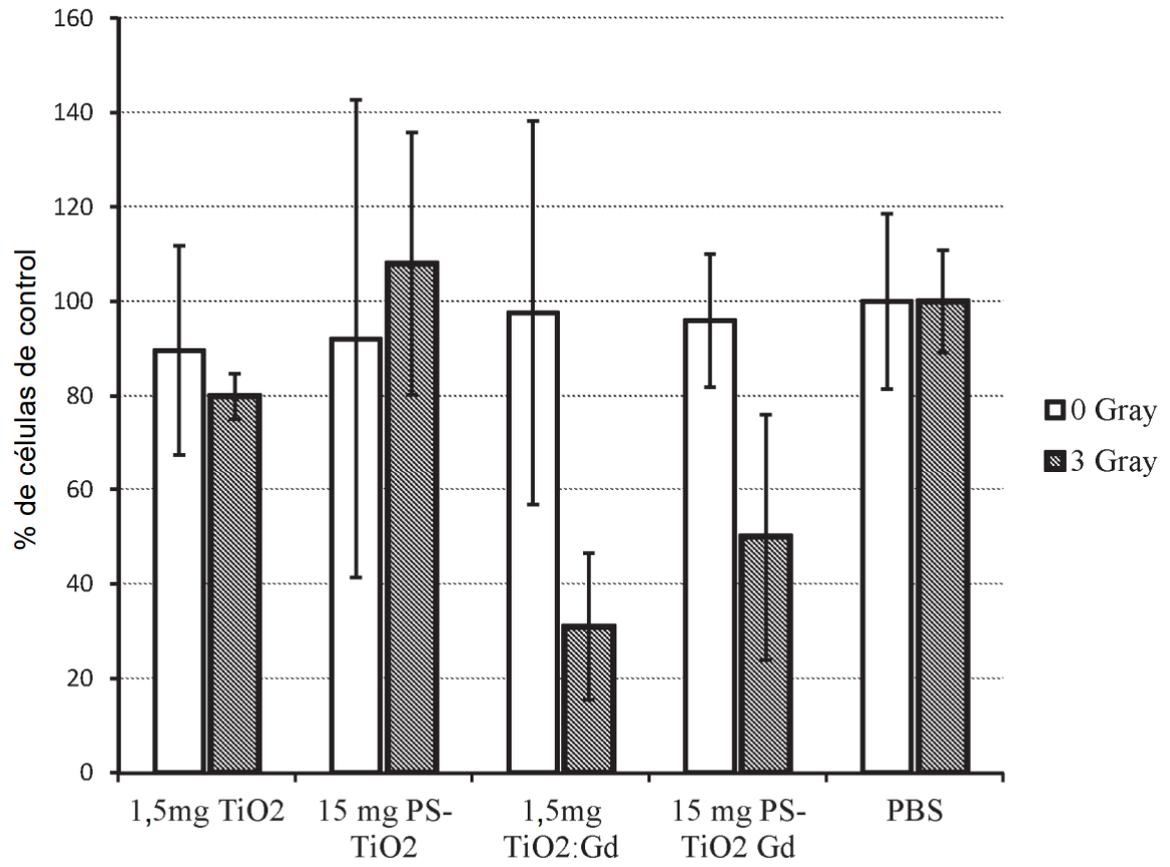


Figura 7

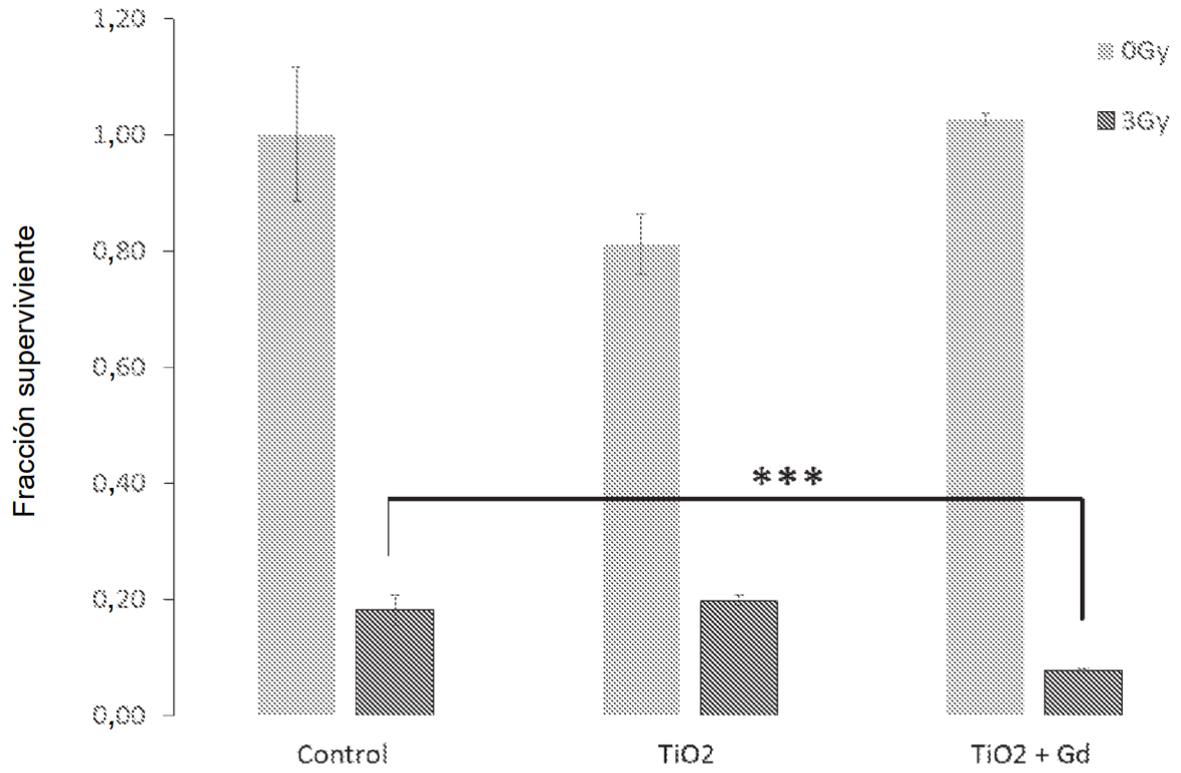


Figura 8

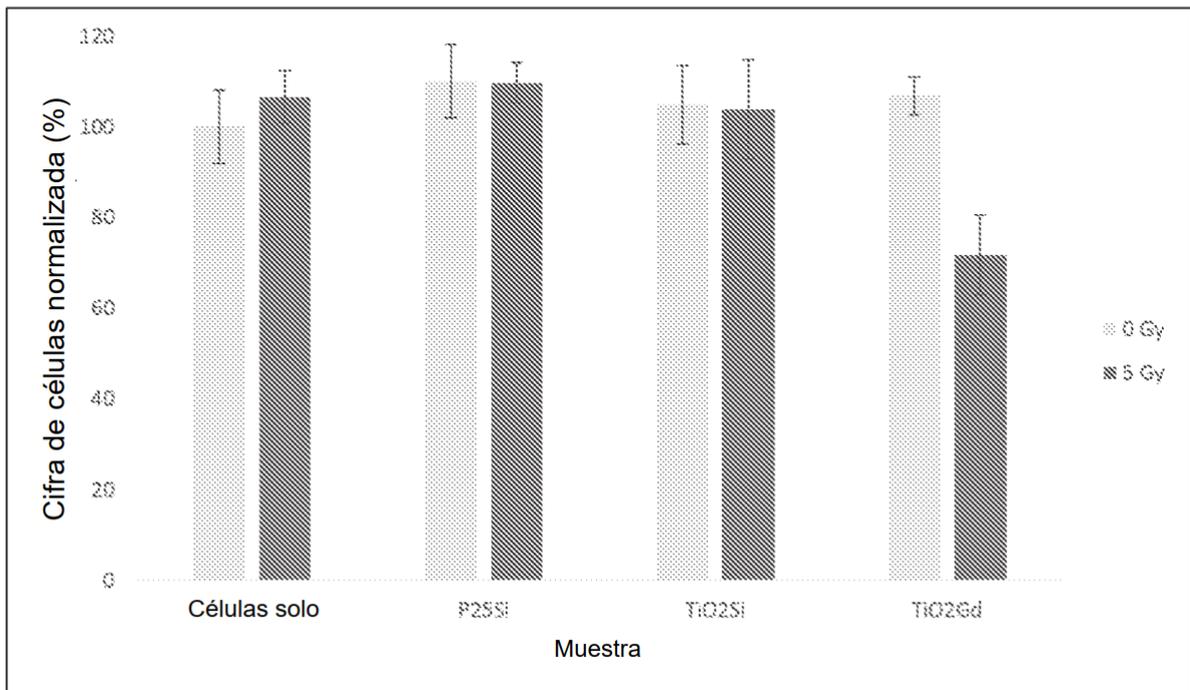


Figura 9

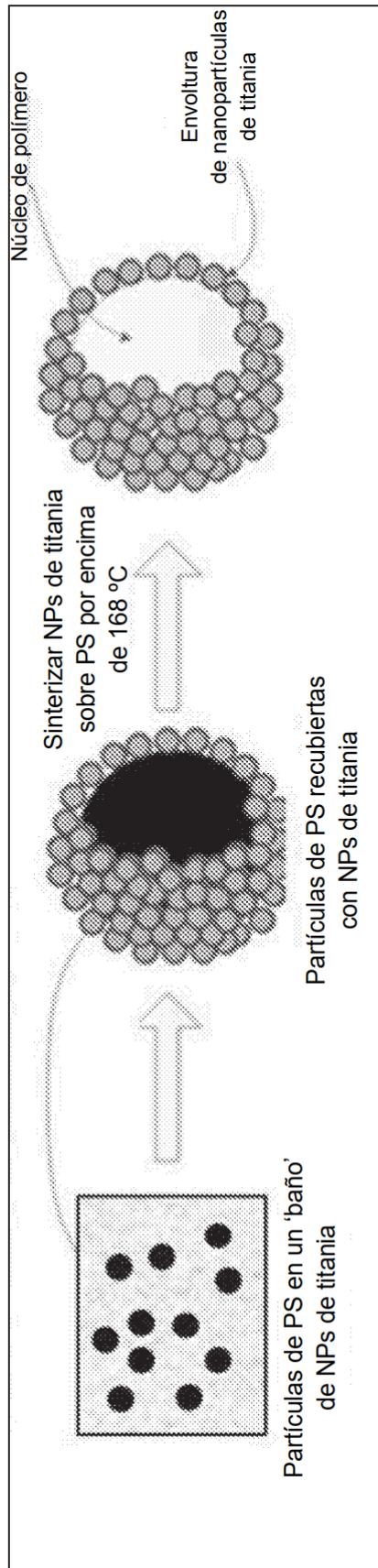


Figura 10

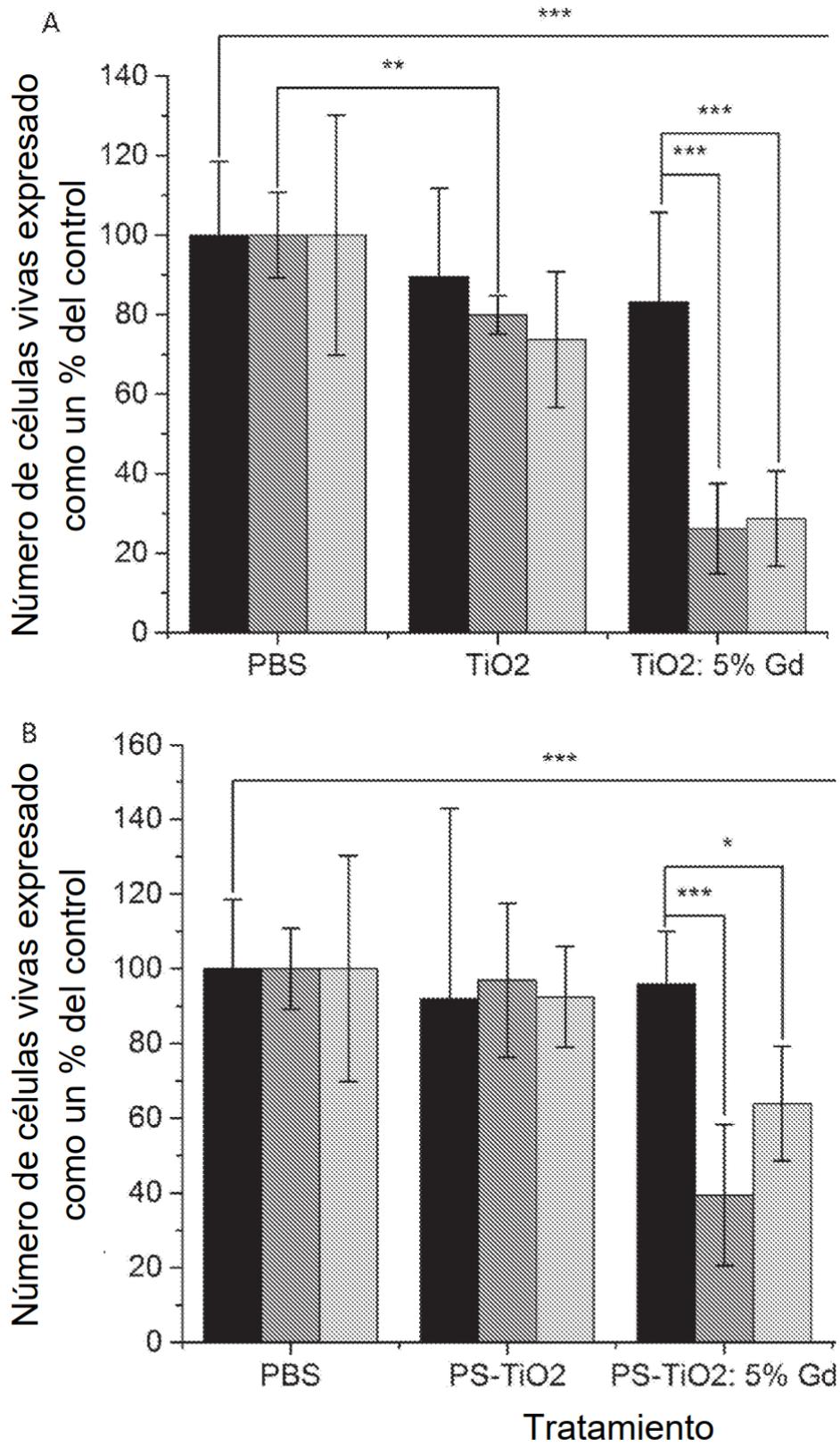


Figura 11