

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 798**

51 Int. Cl.:

A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2015 PCT/CZ2015/000068**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16000669**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2015 E 15801986 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3160509**

54 Título: **Composición antitumoral basada en ácido hialurónico y nanopartículas inorgánicas, método de preparación de la misma y uso de la misma**

30 Prioridad:

30.06.2014 CZ 20140451

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2020

73 Titular/es:

**CONTIPRO A.S. (100.0%)
Dolni Dobrouc 401
56102 Dolni Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**SMEJKALOVA, DANIELA;
NESPOROVA, KRISTINA;
TEPLA, MARTINA;
SYROVATKA, JAKUB;
HUERTA-ANGELES, GLORIA;
POSPISILOVA, MARTINA;
MATUSKA, VIT;
MRAZEK, JIRI;
GALISOVA, ANDREA;
JIRAK, DANIEL y
VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 768 798 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

Composición antitumoral basada en ácido hialurónico y nanopartículas inorgánicas, método de preparación de la misma y uso de la misma

Campo de la técnica

5 La invención se refiere a una composición basada en ácido hialurónico que se puede usar para el tratamiento de enfermedades tumorales. La composición incluye nanomicelas poliméricas que comprenden un derivado hidrofobizado de ácido hialurónico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y nanopartículas estabilizadas por medio de ácido oleico, preferiblemente nanopartículas superparamagnéticas de hierro, nanopartículas de zinc o nanopartículas de conversión ascendente (upconversion).

Técnica anterior

10 En el tratamiento de enfermedades tumorales, la quimioterapia es usada con mayor frecuencia, donde se administran al paciente por vía intravenosa u oral sustancias medicinales que se distribuyen sistémicamente en todo el cuerpo. Sin embargo, las sustancias antitumorales son muy tóxicas no sólo con respecto a las células tumorales sino también con respecto a las células sanas. La consecuencia de la distribución sistémica por lo tanto es la toxicidad de los
15 agentes terapéuticos antitumorales no sólo en las áreas con una enfermedad tumoral, sino también en las áreas de tejidos y células sanas. Además, la distribución no selectiva del fármaco disminuye la cantidad de sustancia medicinal que llega a las células tumorales al final, reduciendo de este modo la eficacia de la terapia.

Debido a los hechos mencionados anteriormente, existe un enorme interés en encontrar una estrategia adecuada que permita mejorar la eficacia quimioterapéutica hacia las células tumorales y al mismo tiempo suprimir la toxicidad sistémica indeseable de los agentes terapéuticos. Se ha encontrado que los efectos secundarios indeseables de las
20 sustancias medicinales se suprimen en gran medida, a veces incluso se eliminan, si el fármaco se incorpora en una matriz de sistemas vehiculares. Para este fin, la investigación se centra a menudo en la focalización de tales sistemas vehiculares hacia las células tumorales.

Actualmente, hay dos estrategias muy frecuentes utilizadas para focalización. Una de ellas se basa en la llamada focalización pasiva donde se usa una mayor permeabilidad y retención de los tejidos tumorales (el llamado efecto
25 EPR) (Maeda, 2001). A diferencia de los tejidos sanos, los tejidos tumorales se caracterizan por una vascularidad perforada por medio de la cual las moléculas de tamaño nanométrico pueden llegar desde el torrente sanguíneo hasta el tumor. Sin embargo, la focalización pasiva está limitada, además de por otros factores, por una captura poco efectiva y no específica de los sistemas vehiculares con una sustancia medicinal por las células tumorales (Duncan & Gaspar,
30 2011; El-Dakdouki, Pure & Huang, 2013). Sin embargo, si el sistema vehicular tiene un tamaño adecuado para la focalización pasiva, dicho método de focalización puede estar asociado con un aumento del efecto antitumoral del agente terapéutico dado con respecto a las células tumorales debido a otras propiedades del vehículo. Por ejemplo, la solicitud de patente N° WO2008/130121 reivindica un conjugado de ciclotrifosfaceno-platino (II) selectivo de tumores y biodegradable que forma micelas poliméricas en soluciones acuosas y, en comparación con los conjugados similares del documento US2001/6333422, presenta una mejor selectividad en la focalización pasiva para los tejidos tumorales.
35 La selectividad mejorada con respecto a las células tumorales en la focalización pasiva se menciona también en la solicitud de patente N° WO2013/188727 que describe nanopartículas PEGiladas biodegradables que comprenden un conjugado de la sustancia medicinal (SN-38, PI-103, etopósido, fenretinida) con un retinoato o un isómero del mismo, unidos por medio de un enlace fenólico ésterico de escisión rápida. El aumento de la selectividad, en ambos casos,
40 fue detectado en base a datos experimentales en comparación con sistemas similares.

Otro método para hacer más eficaz la focalización y, por lo tanto, la selectividad de la acción del fármaco es la posibilidad de que los agentes terapéuticos sean modificados por ligandos que tienen una alta afinidad para los receptores localizados en la superficie de las células tumorales (Duncan & Gaspar, 2011; Ruoslahti, Bhatia & Sailor,
45 2010). Esta segunda estrategia, que es conocida como focalización activa, debe asegurar una distribución selectiva del agente terapéutico en las células tumorales. Un ejemplo puede ser, p. ej. la solución descrita en el documento US2007/0155807 donde se reivindican derivados de ácidos carboxílicos de amidas tiazolidinonas y de amidas tiazolidininas, en los que se detectó un comportamiento selectivo hacia las células de melanoma que presentan un aumento de la expresión del receptor de LPL. La desventaja de esta y otras soluciones similares es el hecho de que los receptores de LPL se expresan también en células sanas, por ejemplo, cardiomiocitos, lo que puede llevar también
50 a su acción selectiva en un tejido sano. Otra desventaja de esta y otras soluciones similares (por ejemplo, documentos WO 2012/173677, US 2013/02742200) es el hecho de que la expresión de los receptores de células tumorales es variable no solo en el tiempo sino también en los pacientes (Duncan & Gaspar, 2011). El ligando unido seleccionado para la focalización activa puede tener entonces un efecto sólo sobre las células en una cierta etapa de la enfermedad tumoral o sólo sobre algunos de los pacientes.

Otra posibilidad de la focalización activa radica en el direccionamiento de los sistemas vehiculares por medio de un campo magnético externo en los casos en que los sistemas comprenden nanopartículas magnéticas unidas covalentemente o no covalentemente. En tal caso, se pueden usar preferiblemente nanopartículas superparamagnéticas (las SPION). Con mayor frecuencia, se trata de nanopartículas de Fe₃O₄ que se consideran

- como medios de contraste inerte en proyección de imagen de resonancia magnética (MRI) sin ninguna función farmacológica prevista (Huang et al., 2013). Hasta el momento no se ha informado de toxicidad a corto o largo plazo para las SPION después de su internalización en una célula (Huang et al., 2013). Además del contraste de MRI y de la focalización magnética, las SPION se pueden usar como vehículos en combinación con citostáticos u otras sustancias medicinales. Otro uso preferido es la hipertermia del fluido magnético en el cual las SPION absorben la energía alterna del campo magnético y la transforman en calor. Por lo tanto, es posible aumentar selectivamente la temperatura en el área en que se localizan las SPION. Si las SPION se localizan en el área del tumor, es posible destruir las células tumorales por medio de una temperatura elevada, debido a que son más sensibles a la temperatura que las células sanas (Laurent, Dutz, Hafeli & Mahmoudi, 2011).
- En combinación con la focalización pasiva o activa, se utilizan varias propiedades distintivas de las células tumorales, en comparación con las células sanas, para mejorar la selectividad de los agentes terapéuticos (Fleige, Quadir & Haag, 2012). Estas propiedades incluyen, por ejemplo, un pH más ácido o un nivel elevado de las formas reactivas de oxígeno (ROS). La solicitud de patente número US2013/0230542 describe componentes terapéuticos (derivados de fenol) que se activan en el entorno en que están presentes las ROS y, por lo tanto, deberían actuar selectivamente en células tumorales que tienen un nivel elevado de ROS. Una desventaja de dicha solución es el hecho de que el nivel elevado de ROS también se encuentra en ciertas células sanas. Son ejemplos los macrófagos donde el alto nivel de ROS permite la eliminación de patógenos en los fagocitos. Un nivel elevado de ROS sirve también en otras células como un mecanismo de defensa natural contra la hipoxia y también como moléculas señal que afectan a una serie de funciones fisiológicas.
- En la bibliografía, también hay composiciones antitumorales que son prometedoras porque *in vitro* actúan de una manera antitumoral con respecto a algunos tipos de células tumorales. Un ejemplo es la composición del documento US 2005/0255173 que comprende uno a tres componentes seleccionados del siguiente grupo: ácido cítrico, zinc y albúmina. Dicha composición era más citotóxica *in vitro* frente a las líneas celulares humanas derivadas de adenocarcinomas NIH:OV-CAR-3 y SKOV-3 en comparación con las células control WI38 (fibroblastos de pulmón humano normales). Un inconveniente de dicha composición es el hecho de que su efecto antitumoral depende del contenido de concentración de los componentes individuales (documento US 2005/0255173). Puesto que los componentes son innatos del cuerpo, el efecto de la composición reivindicada se puede ver influenciado por la concentración local de sustancias individuales en el lugar de administración dado (por ejemplo, una concentración alta de albúmina en sangre).
- El documento WO 2014/082609 describe ácido hialurónico anfífilo C6-C18 para encapsulación de compuestos hidrófobos, incluyendo compuestos citostáticos tales como paclitaxel. El inconveniente de estos sistemas es que no son selectivamente citotóxicos, ya que son citotóxicos tanto para las células sanas como para las células cancerosas.
- El documento Dong-Eun Lee et al.: "Amphiphilic hyaluronic acid-based nanoparticles for tumor specific optical/MR dual imaging", Journal of Materials Chemistry, vol. 22, no. 21, page 10444, GB ISSN; 0959-9428, XP055237894, 1 enero 2012, describe la encapsulación de las SPION hidrófobas en ácido hialurónico modificado covalentemente con ácido cítrico para una detección *in vivo* de las partículas SPION por resonancia magnética. Sin embargo, no se ha observado ningún comportamiento citotóxico del sistema.
- El documento Yuhan Lee et al.; "Bioinspired Surface Immobilization of Hyaluronic Acid on Monodisperse Magnetic Nanocrystals for Targeted Cancer Imaging", Advanced Materials, DE ISSN; 0935-9648, XP055237885, 6 octubre 2008, describe la inmovilización de ácido hialurónico sobre nanocristales de óxido de hierro para las células tumorales objetivo a través del receptor de CD44. Sin embargo, para este fin, se utiliza bromuro de cetiltrimetil amonio, que se sabe que es citotóxico. Por lo tanto, este sistema es citotóxico tanto para las células tumorales como para las células sanas.
- El documento Kumar et al.; "Development of hyaluronic acid Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Elsevier, NL, vol. 3, no. 2, pages 132-137, ISSN; 1549-9634, XP02211621, 1 junio 2007, describe nanopartículas de ácido hialurónico que se preparan por reticulación con dihidrazida antes de la interacción con Fe₂O₃. Estas nanopartículas se utilizan entonces para la administración a las células de péptidos solubles en agua (hidrófilos).
- Las publicaciones citadas demuestran que la investigación de los agentes terapéuticos antitumorales se realiza en todo el mundo. Sin embargo, el éxito del uso clínico de las soluciones propuestas sigue siendo un reto, especialmente debido al hecho de que la mayoría de las soluciones incluyen polímeros orgánicos que no son biodegradables y que no tienen una selectividad suficiente hacia las células tumorales. Por ese motivo, todavía existe un interés en encontrar nuevas composiciones que tengan efectos selectivos sobre las células tumorales.

Objeto de la invención

- El objeto de la invención radica en nanomicelas de hialuronano combinadas con nanopartículas inorgánicas como agentes terapéuticos antitumorales selectivos. Más específicamente, la invención se refiere a una composición basada en ácido hialurónico hidrofobizado y nanopartículas inorgánicas, que actúa selectivamente con respecto a las células derivadas de carcinoma colorrectal o adenocarcinoma, carcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular y carcinoma

de mama. La composición se puede utilizar también como medio de contraste *in vivo*. Además, la invención se refiere al método de preparación de dicha composición.

La composición se basa en la carga de nanopartículas inorgánicas, estabilizadas por ácido oleico, en nanomicelas de hialuronano hidrofobizado. La carga se puede realizar por sonicación de soluciones de nanopartículas en un disolvente orgánico con una solución de hialuronano hidrofobizado en agua. Las nanomicelas resultantes que comprenden nanopartículas inorgánicas se someten entonces a centrifugación y se separan de este modo de las nanopartículas inorgánicas libres y se pueden usar para un efecto selectivo sobre las células tumorales. La principal y única ventaja de la composición de la invención es su actividad selectiva *in vitro* con respecto a las células tumorales, incluso en el caso en que es tratada una mezcla de células tumorales y de control. La composición contiene nanopartículas inorgánicas, estabilizadas por ácido oleico, en donde la finalidad original de las nanopartículas inorgánicas era permitir una detección *in vivo* de la composición después de su administración al cuerpo. Sin embargo, se encontró sorprendentemente que en combinación con el ácido hialurónico hidrofobizado, especialmente derivado de oleilo del ácido hialurónico, dicha composición es selectivamente citotóxica con respecto a las células tumorales *in vitro* incluso sin ninguna sustancia citostática ni otra sustancia terapéutica. Este efecto inesperado e inexplicable hasta ahora se observó para las nanopartículas SPION, las nanopartículas de óxido de zinc y las nanopartículas de conversión ascendente, con la condición de que estén estabilizadas con ácido oleico. Ni el efecto inesperado puede ser explicado claramente como un efecto mediado por el receptor, mediado a través de los receptores de CD44 que son específicos para el hialuronano, ni la selectividad observada, según los datos recopilados hasta ahora, puede ser asociada con la influencia de un aumento de la producción de ROS. Sin embargo, la selectividad puede ser causada por otro mecanismo de una liberación intracelular de iones en nanopartículas. El efecto selectivo sobre las células tumorales es aún más sorprendente ya que las SPION incorporadas en los vehículos basados en un polisacárido u otra matriz polimérica se utilizan para ser interpretadas como no citotóxicas (El-Dakdouki et al., 2012; Li, Kim, Tian, Yu, Jon y Moon, 2012).

Otras ventajas de dicha composición incluyen la compatibilidad con soluciones fisiológicas, la posibilidad de una administración intravenosa *in vivo* y la estabilidad de nanomicelas con el tiempo a pH fisiológico. Otra ventaja de la composición es el uso de hialuronano como el polímero vehículo que forma una envoltura alrededor de los sistemas de nanomicelas, asegurando de este modo la compatibilidad de la composición para una administración *in vivo*. Preferiblemente, el hialuronano puede soportar también la unión de dicha composición a las células tumorales, caracterizadas por un aumento en la expresión del receptor de CD44. La presencia de las SPION en la composición se puede usar preferiblemente para el direccionamiento de los vehículos a la localización deseada en el cuerpo por medio del campo magnético. Un campo magnético alternativo puede servir para inducir hipertermia que lleva a la destrucción del tejido tumoral. Otra ventaja es que la composición dada se puede combinar con otras sustancias activas, tales como los citostáticos. De manera similar a las SPION y nanopartículas de óxido de zinc, la presencia de nanopartículas de conversión ascendente se puede usar preferiblemente para una detección *in vivo* de la composición en el tejido. Además, las nanopartículas de conversión ascendente que tienen una composición específica se pueden usar para terapia fotodinámica o para la liberación controlada de un medicamento de la composición. La presencia de nanopartículas de óxido de zinc se puede usar preferiblemente en tejidos tumorales que tienen un pH más ácido, donde las nanopartículas de ZnO se pueden disolver y se liberan iones Zn^{2+} , mientras que son localmente citotóxicas a concentraciones más altas.

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición antitumoral basada en hialuronano acilado y nanopartículas inorgánicas estabilizadas por ácido oleico y seleccionadas del grupo que comprende nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de conversión ascendente o nanopartículas de óxido de zinc, especialmente nanopartículas superparamagnéticas. El hialuronano acilado puede ser un derivado acilado C_6-C_{18} de ácido hialurónico que tiene enlaces saturados e insaturados, especialmente el derivado acilado C_{18-1} de ácido hialurónico, y dicho hialuronano acilado sirve como un vehículo de nanopartículas inorgánicas. En caso de que la composición según la invención contenga nanopartículas superparamagnéticas, estas son preferiblemente nanopartículas a base de óxidos de hierro donde la cantidad de Fe en la composición es del 0,3 al 3 % en peso, preferiblemente del 1,0 % en peso. El tamaño de las nanopartículas superparamagnéticas es de 5 a 20 nm, preferiblemente 5-7 nm, más preferiblemente 5 nm. En caso de que la composición antitumoral contenga nanopartículas de óxido de zinc, éstas están presentes en la composición preferiblemente en una cantidad de 0,3 a 3 % en peso de Zn. En caso de que la composición antitumoral contenga nanopartículas de conversión ascendente, estas están preferiblemente presentes en una cantidad tal que la cantidad total de elementos de tierras raras en la composición es de 0,3 a 3 % hm. Las nanopartículas de conversión ascendente pueden comprender, por ejemplo, Er, Yb e Y. La ventaja de la composición según la invención es también el hecho de que es posible que sea esterilizada en el envase final por medio de autoclavado.

La composición antitumoral según la invención se puede usar especialmente para una inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales humanas tanto adherentes como en suspensión derivadas de carcinoma colorrectal y adenocarcinoma, carcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular, carcinoma de mama, preferiblemente carcinoma colorrectal y adenocarcinoma. Además, la composición antitumoral que comprende nanopartículas superparamagnéticas se puede usar como una sustancia de contraste *in vivo*, es decir, para la detección de la acumulación de la composición en el cuerpo, especialmente en el hígado y formaciones patológicas, por ejemplo, en tumores. Se encontró que la composición según la invención presenta una manera diferente de liberación de iones metálicos, *in vitro* en células tumorales y no tumorales, especialmente en células derivadas de adenocarcinoma colorrectal humano (= tumor) y fibroblastos dérmicos humanos (= no tumor).

La composición antitumoral según la invención se puede aplicar en una formulación para administración parenteral o local, por ejemplo, por vía intravenosa. Puede comprender además otros aditivos usados en composiciones farmacéuticas, preferiblemente cloruro de sodio, dextrosa o sales tamponantes.

- 5 La composición según la invención se puede preparar de la siguiente manera: se prepara una solución acuosa de derivado acilado de ácido hialurónico, después se añaden partículas inorgánicas dispersadas en un disolvente haluro, por ejemplo cloroformo, siendo estabilizadas las partículas inorgánicas con ácido oleico y seleccionadas del grupo que comprende nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de conversión ascendente o nanopartículas de óxido de zinc, y la suspensión resultante se somete a sonicación hasta que se forma una mezcla homogénea, y después las nanopartículas inorgánicas libres se separan de las nanopartículas inorgánicas cargadas en nanomicelas por medio de centrifugación y posterior filtración. El filtrado se puede liofilizar o esterilizar después en autoclave con el fin de un almacenamiento a largo plazo. El liofilizado se puede disolver entonces en una solución acuosa y esterilizar por autoclavado.

Para los fines de la invención, se pueden usar las SPION comercialmente disponibles, estabilizadas por ácido oleico.

Bibliografía

- 15 Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101-2141.
- El-Dakdouki, M. H., Pure, E., & Huang, X. (2013). Development of drug loaded nanoparticles for tumor targeting. Part 1: synthesis, characterization, and biological evaluation in 2D cell cultures. *Nanoscale*, 5(9), 3895-3903.
- El-Dakdouki, M. H., Zhu, D. C., El-Boubbou, K., Kamat, M., Chen, J., Li, W., & Huang, X. (2012). Development of Multifunctional Hyaluronan-Coated Nanoparticles for Imaging and Drug Delivery to Cancer Cells. *Biomacromolecules*, 20 13(4), 1144-1151.
- Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 866-884.
- Huang, G., Chen, H., Dong, Y., Luo, X., Yu, H., Moore, Z., Bey, E. A., Boothman, D. A., & Gao, J. (2013). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy. *Theranostics*, 25 3(2), 116-126.
- Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2011). Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1-2), 8-23.
- Li, M., Kim, H. S., Tian, L., Yu, M. K., Jon, S., & Moon, W. K. (2012). Comparison of Two Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides on Cytotoxicity and MR Imaging of Tumors. *Theranostics*, 2(1), 76-85.
- 30 Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation*, 41(1), 189-207.
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *The Journal of Cell Biology*, 188(6), 759-768.

Breve descripción de los dibujos

- 35 Figura. 1. Fotografía por TEM (microscopio electrónico de transmisión) de nanopartículas (SPION) encapsuladas en hialuronano hidrofobizado.
- Figura. 2A, 2B, 2C. Inhibición de la viabilidad, por la composición de hialuronano acilado con SPION, en la línea tumoral HT-29 en comparación con el efecto positivo/neutro en los fibroblastos de control NHDF y una línea 3T3 no tumoral de ratón.
- 40 Figura. 3. Influencia de la composición de hialuronano acilado con SPION sobre la inhibición de la viabilidad de varias líneas celulares tumorales en comparación con el efecto positivo en los fibroblastos de control NHDF y una línea 3T3 no tumoral de ratón.
- Figura. 4A, 4B, 4C. Comparación de la influencia de las composiciones de un hialuronano acilado con SPION encapsuladas de 5 nm, 10 nm a 20 nm sobre la viabilidad de las células tumorales HT-29 y las NHDF y 3T3 sanas.
- 45 Figura. 5A, 5B, 5C. Inhibición de la viabilidad por medio de la composición de un hialuronano acilado con nanopartículas de zinc en la línea tumoral HT-29 en comparación con el efecto positivo/neutro en los fibroblastos de control NHDF y una línea 3T3 no tumoral de ratón.
- Figura. 6A, 6B, 6C. Inhibición de la viabilidad por medio de la composición de un hialuronano acilado con nanopartículas de conversión ascendente en la línea tumoral HT-29 en comparación con el efecto positivo/neutro en los fibroblastos de control NHDF y una línea 3T3 no tumoral de ratón.
- 50

Figura. 7. Cultivo conjunto de fibroblastos NHDF sanos y células de control HT-29 con la composición de un hialuronano acilado con SPION.

Figura. 8. Expresión del receptor de CD44 sobre la superficie de las células NHDF, MCF-7 y MDA-MB-231 determinada por medio de citometría de flujo.

- 5 Figura. 9. Inducción de la formación de ROS por medio de la composición de un hialuronano acilado con SPION en NHDF y HT-29.

Figura. 10. Tinción intracelular de Fe en células tumorales HT-29 y células de control NHDF después de la incubación con la composición de un hialuronano acilado con SPION (escala: 10 μ m)

- 10 Figura. 11. Detección por MRI de la acumulación en el tiempo de las SPION cargadas en un hialuronano acilado después de una administración intravenosa en un tumor (tumor de glioblastoma, 1,1 mg de Fe/kg).

Figura. 12. Contraste por MRI del hígado después de una administración intravenosa de la composición de SPION cargada en un hialuronano acilado (1,1 mg de Fe/kg).

Figura. 13. Detección de Fe en secciones histológicas de un tumor (2 y 24 horas después de la administración de la composición de SPION) después de su tinción con azul de Prusia.

- 15 Figura. 14. Detección de Fe en secciones histológicas de hígado (2 y 24 horas después de la administración de la composición de SPION) después de la tinción del mismo con azul de Prusia.

Figura. 15. Fotografía por TEM de nanopartículas (SPION) encapsuladas en hialuronano hidrofobizado después de esterilización.

Figura. 16. Citotoxicidad selectiva de la composición de SPION antes y después de la esterilización en autoclave.

- 20 Figura. 17A, 17B, 17C. Inducción de apoptosis por medio de la composición de SPION en una línea EL4 de linfoma tumoral de ratón.

Ejemplos

SS = grado de sustitución = $100 \% \cdot \text{cantidad molar del sustituto unido} / \text{cantidad molar de todos los dímeros de polisacáridos}$

- 25 El término equivalente (eq) utilizado en la presente memoria se refiere a un dímero de ácido hialurónico, si no se indica otra cosa. Los porcentajes son porcentajes en peso, si no se indica otra cosa.

El peso molecular del ácido hialurónico (fuente: Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobroue, CZ) se determinó por SEC-MALLS.

- 30 El término nanopartículas inorgánicas significa nanopartículas inorgánicas que tienen una función de diagnóstico, donde la función de diagnóstico es una propiedad común esencial de las nanopartículas inorgánicas utilizadas en la composición según la invención. La función de diagnóstico se pretende que signifique la posibilidad de detectar dichas partículas por métodos disponibles en medicina. Las SPION se pueden detectar por medio de resonancia magnética y el ZnO y las nanopartículas de conversión ascendente por medio de imágenes de luminiscencia, y todas estas partículas están sólo optimizadas para la detección, y esto es por lo que se usan. Por lo tanto, de un conjunto de
35 nanopartículas inorgánicas, se seleccionaron aquellas que permiten la detección (de micelas) *in vivo* o *in vitro*.

El término nanopartículas de conversión ascendente significa nanopartículas de lantánidos de conversión ascendente, es decir, nanopartículas que contienen elementos del grupo de las tierras raras, ya que no se conocen otras nanopartículas inorgánicas capaces de una conversión ascendente de energía efectiva.

- 40 Ejemplo 1. Preparación de ácido hialurónico hidrofobizado, más específicamente el derivado de oleilo (C18:1) de ácido hialurónico por medio de anhídrido mixto de ácido benzoico y ácido oleico

- 45 Se disolvieron 100 g de hialuronano de sodio (250 mmol, 15 kDa) en 2000 ml de agua desmineralizada. Después se añadieron gradualmente 1000 ml de isopropanol. Posteriormente, se añadieron a la solución TEA (70 ml, 3 equivalentes) y DMAP (1,52 g, 0,05 equivalentes). Al mismo tiempo, se disolvió ácido oleico (35,3 g 0,5 equivalentes) en 1000 ml de isopropanol, después se añadieron a la solución TEA (70 ml, 3 equivalentes) y cloruro de benzoilo (14,4 ml, 0,5 equivalentes). Después de la activación del ácido, se filtró el precipitado a la solución preparada de HA. La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente. Después, se diluyó la mezcla de reacción con 1000 ml de agua desmineralizada con una adición de 95 g de NaCl. El derivado acilado se aisló de la mezcla de reacción por precipitación utilizando un cuádruple de isopropanol absoluto. Después de decantación, se lavó el precipitado repetidamente con una solución acuosa de isopropanol (85 % en volumen).

50

SS 13 % (determinado a partir de NMR).

^1H NMR (D_2O): δ 0,88 (t, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), δ 1,22-1,35 (m, 20H, $(-\text{CH}_2-)_{10}$),

δ 1,60 (m, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$), δ 2,0 (4H, $(-\text{CH}_2-)_{2}$), δ 2,41 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), δ 5,41 (d, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$)

5 Este ejemplo describe un método general de síntesis de un derivado hidrofobizado de hialuronano. Sin embargo, el procedimiento no sólo se limita al derivado de oleilo. Una descripción detallada de la síntesis de derivados hidrofobizados se menciona en la solicitud de patente N° CZ PV2012-842.

Ejemplo 2. Preparación de SPION que tienen un tamaño medio de 5 nm

10 Se añadieron 1,80 g de oleato férrico, 0,35 ml de ácido oleico y 13,35 ml de 1-octadeceno a un matraz de tres bocas que tenía un volumen de 50 ml. Se calentó la mezcla lentamente a vacío a 100 °C, donde se mantuvo durante 30 minutos para separar los componentes volátiles. Después, se calentó la mezcla bajo un flujo suave de argón a 280 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 60 minutos. Se hizo burbujear argón a través de la mezcla durante la reacción a 280 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió acetona a la mezcla de reacción y se separaron las nanopartículas por centrifugación. Las SPION precipitadas se lavaron después 4 veces con una mezcla de hexano/acetona (la relación sucesivamente 1:4 a 1:1) y finalmente, se dispersaron en tolueno y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad.

Rendimiento: 78 %

Tamaño de las nanopartículas: $5,2 \pm 0,8$ nm (según la fotografía por microscopio electrónico)

Ejemplo 3. Preparación de SPION que tienen un tamaño medio de 10 nm

20 Se añadieron 1,80 g de oleato férrico, 0,35 ml de ácido oleico y 13,35 ml de 1-octadeceno a un matraz de tres bocas que tenía un volumen de 50 ml. Se calentó la mezcla lentamente a vacío a 100 °C, donde se mantuvo durante 30 minutos para separar los componentes volátiles. Después se calentó la mezcla bajo un flujo suave de argón hasta el punto de ebullición (~ 317 °C) y se mantuvo a esta temperatura durante 60 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se separaron las SPION de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Rendimiento: 74 %

25 Tamaño de las nanopartículas: $9,8 \pm 0,5$ nm (según la fotografía por microscopio electrónico)

Ejemplo 4. Preparación de SPION que tienen un tamaño medio de 20 nm

30 Se añadieron 1,80 g de oleato férrico, 0,35 ml de ácido oleico y 5,34 ml de 1-octadeceno y 6 g de n-docosano a un matraz de tres bocas que tenía un volumen de 50 ml. Se calentó la mezcla lentamente a vacío a 100 °C, donde se mantuvo durante 30 minutos para separar los componentes volátiles. Después, se calentó la mezcla bajo un flujo de argón suave a 315 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 60 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se separaron las SPION de la misma manera que en el Ejemplo 2.

Rendimiento: 56 %

Tamaño de las nanopartículas: $21,1 \pm 3,1$ nm (según la fotografía del microscopio electrónico)

Ejemplo 5. Preparación de nanopartículas de ZnO

35 Se introdujo acetato de zinc dihidratado (1185,30 mg; 5,4 mmol) en un matraz de tres bocas que tenía un volumen de 250 ml y se disolvió en metanol (90 ml) a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó una solución de hidróxido de tetrametilamonio (1622,91 mg; 8,96 mmol) en metanol (22,39 ml) en un matraz de dos bocas. Las dos soluciones mencionadas anteriormente se desgasificaron en un baño de ultrasonidos mientras se pasaban a su través burbujas de argón durante 15 minutos (la temperatura del baño acuoso era 50 °C, potencia de salida 120 W). La solución en metanol de acetato de zinc se calentó a reflujo en un baño de aceite (la temperatura del baño era de 60 °C). Después de la adición de ácido oleico (310 μl ; 0,99 mmol) se llevó la mezcla al punto de ebullición (temperatura del baño 85 °C). La solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol se calentó a reflujo (temperatura del baño 75 °C) y se añadió rápidamente al matraz de tres bocas que contenía acetato de zinc y ácido oleico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo mientras se agitaba constantemente (600 rpm) y se pasaron a su través burbujas de argón durante 2 minutos (temperatura del baño 85 °C). Después se diluyó la mezcla con metanol (90 ml) y se enfrió durante 15 minutos en un baño de hielo. La mezcla enfriada se centrifugó durante 15 minutos ($4000 \times g$, 4 °C). Se lavaron las partículas con etanol (3 x 25 ml), cada etapa de lavado fue seguida por centrifugación durante 10 minutos ($4000 \times g$, 25 °C). Se dispersaron las partículas en cloroformo (45 ml) y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad.

Eficiencia cuántica de fluorescencia: 34 % (determinada por un método relativo, estándar = norharman)

50 Tamaño de las nanopartículas: $3,4 \pm 0,3$ nm (según la fotografía del microscopio electrónico)

Ejemplo 6. Preparación de nanopartículas de conversión ascendente

- Las cantidades molares correspondientes a 1,60 mmol de acetato de itrio (III), 0,36 mmol de acetato de iterbio (III) y 0,04 mmol de acetato de erbio (III) se introdujeron en un matraz de tres bocas con un volumen de 100 ml y se añadieron octadec-1-eno (34 ml) y ácido oleico (12,0 ml). Se hizo el vacío a la mezcla mientras se agitaba con fuerza (600 rpm) y se calentó lentamente en un baño de aceite a 80 °C. A esta temperatura, se agitó la mezcla al vacío hasta la clarificación total y desde ese momento durante 90 minutos más. El matraz con la mezcla se llenó con argón y, después de enfriar hasta temperatura ambiente en una atmósfera de argón, se añadió una solución de NaOH (200 mg) y NH₄F (296,3 mg) en metanol (20 ml), tras lo cual la mezcla se volvió turbia inmediatamente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche, después se evaporó lentamente el metanol a 65 °C (baño de aceite). Después, se transfirió el matraz con la mezcla a una manta calefactora controlada por un controlador PID. Se introdujo gradualmente vacío a la mezcla, se calentó lentamente la mezcla al vacío a 112 °C y a esta temperatura se desgasificó durante 30 minutos. Después, el matraz que contenía la mezcla se llenó con argón y bajo reflujo de aire se calentó a 305 °C en un flujo suave de argón a una velocidad de 2 °C/min. Se dejó la mezcla a 305 °C durante 110 minutos, después de separar el calentamiento, se enfrió naturalmente hasta temperatura ambiente.
- Las nanopartículas de conversión ascendente se precipitaron de la mezcla de reacción por etanol (un volumen doble del volumen de la mezcla de reacción) y después se aislaron por centrifugación (RCF 3000 x g; 10 minutos). Las nanopartículas (sedimento) se dispersaron en hexano (5 ml), se precipitaron con etanol (10 ml) y se separaron por medio de centrifugación (RCF 3000 x g; 7 minutos). Las nanopartículas se purificaron de esta manera tres veces por el sistema hexano/etanol y tres veces por el sistema hexano/acetona. Finalmente, se dispersaron las nanopartículas en cloroformo (10 ml) y se almacenaron a temperatura ambiente.

Composición de las nanopartículas (ICP-OES): NaYF₄:Yb/Er (80 % en moles de Y, 18 % en moles de Yb, 2 % en moles de Er)

Fracción de componentes orgánicos (TGA): 7 %

Tamaño de las nanopartículas (microscopio electrónico): 34 ± 2 nm

Ejemplo 7. Preparación de la composición de un derivado de capronilo de ácido hialurónico (HAC6) con las SPION

- Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC6, DS = 60 %, Peso molecular = 38 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.
- La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, se sonicó la solución durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó después durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,1 % (en peso)

Ejemplo 8. Preparación de la composición de un derivado de caprililo de ácido hialurónico (HAC8) con las SPION

- Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC8, DS = 22 %, Peso molecular = 20 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.
- La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, se sonicó la solución durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó después durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,1 % (en peso)

Ejemplo 9. Preparación de la composición de un derivado de caprinilo de ácido hialurónico (HAC10) con las SPION

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC10, DS = 15 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado

según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

5 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación por ICP): 1,2 % (en peso)

Ejemplo 10. Preparación de la composición de un derivado de palmitoilo de ácido hialurónico (HAC16) con las SPION

15 Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC16, DS = 9 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

20 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,2 % (en peso)

Ejemplo 11. Preparación de la composición de un derivado de estearilo de ácido hialurónico (HAC18) con las SPION

30 Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18: 0, DS = 9 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

35 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

40 Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,0 % (en peso)

Ejemplo 12. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con las SPION

45 Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

50 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,0 % (en peso)

La morfología de las nanopartículas agrupadas en la micela polimérica se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 13. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con las SPION

5 Se disolvieron 120 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 12 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

10 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 7,25 mg de SPION dispersadas en 4 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,8 % (en peso)

Ejemplo 14. Preparación de la composición de derivado de linoleilo de ácido hialurónico (HAC18: 2) con las SPION

20 Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18: 2, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 4 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

25 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

30 Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 0,98 % (en peso)

Ejemplo 15. Preparación de la composición de un derivado de linolenilo de ácido hialurónico (HAC18: 3) con las SPION

35 Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18: 3, DS = 3 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 4 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

40 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,0 % (en peso)

45 Ejemplo 16. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con las SPION

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 10 nm), preparadas según el Ejemplo 3, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

50 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La

suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y se liofilizó.

5 Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 0,4 % (en peso)

Ejemplo 17. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con las SPION

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Las SPION (estabilizadas por ácido oleico, tamaño de las nanopartículas: 20 nm), preparadas según el
10 Ejemplo 4, se transfirieron desde el medio de tolueno al medio de cloroformo.

La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION dispersadas en 3 ml de CHCl_3 (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La
15 suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y se liofilizó.

Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,7 % (en peso)

20 Ejemplo 18. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con las SPION y paclitaxel

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético. Después, se transfirieron desde tolueno a cloroformo 5 mg de SPION (estabilizadas por ácido oleico,
25 tamaño de las nanopartículas: 5 nm), preparadas según el Ejemplo 2. Las nanopartículas preparadas de esta manera se mezclaron con 6 mg de paclitaxel disueltos en 3 ml de cloroformo.

La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de SPION con
30 6 mg de paclitaxel en CHCl_3 (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres y el paclitaxel se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas y paclitaxel se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y se liofilizó.

35 Cantidad de Fe cargada (determinación de ICP): 1,5 % (en peso)

Cantidad de PTX cargada (determinación de HPLC): 0,3 % (en peso)

Ejemplo 19. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con nanopartículas de ZnO

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético.
40

La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de ZnO (del
45 Ejemplo 5) dispersados en 3 ml de CHCl_3 (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y se liofilizó.

50 Cantidad de Zn cargada (determinación de ICP): 1,6 % (en peso)

Ejemplo 20. Preparación de la composición de un derivado de oleilo de ácido hialurónico (HAC18:1) con nanopartículas de conversión ascendente

Se disolvieron 150 mg de derivado acilado de hialuronano (HAC18:1, DS = 12 %, Peso molecular = 15 kDa) preparado

según el Ejemplo 1, durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en un agitador magnético.

5 La solución de hialuronano acilado se transfirió a un recipiente de sonicación tipo *rosette* (RZ 1, volumen: 25 ml), y se sumergió en un baño de hielo. En primer lugar, la solución se sonicó durante 60 s (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Después, se añadieron gradualmente a dicha solución 5 mg de nanopartículas de conversión ascendente (del Ejemplo 6) dispersadas en 3 ml de CHCl₃ (parámetros de sonicación: 200 W, amplitud 85 %, ciclo 0,8 s y sonotrodo S2). La suspensión homogeneizada se sonicó adicionalmente durante 15 minutos (parámetros de sonicación: amplitud 65 %, ciclo 0,5 s y sonotrodo S2). Las nanopartículas libres se separaron por medio de centrifugación repetida (3 x 4500 RPM, 10 min) y el sobrenadante resultante que contenía 10 nanomicelas de hialuronano con las nanopartículas cargadas se retiró, se filtró a través de un filtro de vidrio de 1,0 µm y se liofilizó.

Cantidad cargada de Er; Y; Yb (determinación de ICP): 0,02; 0,50; 0,19 % (en peso)

Ejemplo 21. Citotoxicidad *in vitro* de la composición de un hialuronano acilado con las SPION

15 Las células primarias y las líneas no tumorales y tumorales (Tabla 1) se sembraron en paneles de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Después, se trataron las células con soluciones de composiciones de un hialuronano acilado con las SPION de los Ejemplos 7-12, 14 y 15 a concentraciones de 10, 100, 200 y 500 µg/ml (concentración de micelas poliméricas en el medio de cultivo). Al mismo tiempo, se midió la viabilidad del hialuronano acilado solo y de las SPION solas (en las concentraciones respectivas). La viabilidad de las células se controló a los 20 tiempos 0, 24, 48 y 72 h por medio del método MTT y los valores resultantes indican la inhibición o activación de la viabilidad celular en el punto de tiempo dado. Se hizo seguimiento de la inhibición de la viabilidad celular de las células tratadas con composiciones de diversos derivados de HA acilados con las SPION (Figuras 2A-C) y de la influencia de la composición HAC18:1 + las SPION (del Ejemplo 12) en varias líneas tumorales (Figura 3). Las figuras 4A-C muestran la comparación de la acción citotóxica de la composición (según el Ejemplo 12, 16, 17) con las SPION de 5, 10 y 20 nm. Las líneas celulares se describen en la Tabla 1.

25 Tabla 1 Lista de las líneas celulares adherentes ensayadas.

Designación de la línea celular	Tipo/origen de la célula
Línea de control	
NHDF	fibroblastos dérmicos humanos primarios
3T3	línea de fibroblastos de ratón
Línea de tumor	
HT29	adenocarcinoma colorrectal humano
A2058	melanoma humano
A549	carcinoma de pulmón humano
C3A	carcinoma hepatocelular humano
MCF7	adenocarcinoma de mama humano
HCT116	carcinoma colorrectal humano
MDA-MB231	adenocarcinoma de mama humano
Caco2	adenocarcinoma colorrectal humano

30 Los resultados de las figuras 2A-C muestran que, a diferencia de las líneas de control (NHDF y 3T3), en el caso de la línea tumoral HT29 hay una inhibición significativa del crecimiento celular. Las inhibiciones más altas se registraron para la composición basada en derivados acilados C18 y C18:1. La composición basada en derivados C18:1 con las SPION respaldó aún más la viabilidad de las células NHDF y 3T3. El hialuronano acilado solo y las SPION no influyeron en la viabilidad de ninguna de las células ensayadas (no se muestran los datos).

35 La composición de HAC18:1 con las SPION se utilizó adicionalmente para tratar otras líneas tumorales (Figura 3). Los datos experimentales mostraron una desaceleración del crecimiento de las líneas tumorales A549, HCT116, C3A, MCF7 y MDA-MB231 y Caco2. Una excepción fue solamente la línea de melanoma A2058 donde la inhibición solamente apareció cuando se trató con la concentración más alta de la composición (500 µg/ml). Los fibroblastos de control (tanto NHDF como 3T3), por el contrario, fueron estimulados significativamente por la composición y ni siquiera la concentración más alta de 500 µg/ml ha demostrado propiedades citotóxicas.

Las Figuras 4A-C confirman la actividad antitumoral selectiva de la composición con las SPION de 5 nm. Este efecto no se observa hasta ese punto para las composiciones con las SPION de 10 y 20 nm.

Ejemplo 22. Citotoxicidad *in vitro* de la composición de un hialuronano acilado con nanopartículas de óxido de zinc

Se sembraron fibroblastos humanos primarios (NHDF), células HT-29 de tumor entérico y una línea 3T3 de fibroblastos de ratón en paneles de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Después, se trataron las células con soluciones de composiciones de un hialuronano acilado con nanopartículas de óxido de zinc del Ejemplo 19 en concentraciones de 10, 100, 200 y 500 µg/ml (concentración de micelas poliméricas). La viabilidad de las células se monitorizó a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h por medio del método MTT y los valores resultantes indican la inhibición o activación de la viabilidad celular en el punto de tiempo dado (Figuras 5A-C).

Los resultados de las Figuras 5A-C muestran que, a diferencia de las líneas de control (NHDF y 3T3), al aumentar el tiempo de incubación y, además, en concentraciones más altas de micelas poliméricas, se produce la inhibición del crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, en este caso, también se observó inhibición del crecimiento en caso de concentración de 500 µg/ml en las células 3T3. A concentraciones más bajas de la composición y también en la línea celular de control NHDF, no se ha observado inhibición.

Ejemplo 23. Citotoxicidad *in vitro* de la composición de un hialuronano acilado con nanopartículas de conversión ascendente

Los fibroblastos humanos primarios (NHDF), las células HT-29 de tumor entérico y la línea 3T3 de fibroblastos de ratón se sembraron en paneles de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C/5 % de CO₂. Después, se trataron las células con soluciones de micelas poliméricas con nanopartículas de conversión ascendente del Ejemplo 20 a concentraciones de 10, 100, 200 y 500 µg/ml (concentración de micelas poliméricas). La viabilidad de las células se monitorizó a los tiempos 0, 24, 48 y 72 h por medio del método MTT y los valores resultantes indican la inhibición o activación de la viabilidad celular en el punto de tiempo dado (Figuras 6A-C).

Los resultados de las Figuras 6A-C muestran que, a diferencia de las líneas de control de NHDF donde la viabilidad aumenta mucho, al aumentar el tiempo de incubación se produce una inhibición del crecimiento de las células tumorales. Sin embargo, se observa una ligera inhibición también en la línea 3T3 no tumoral.

Ejemplo 24. Citotoxicidad selectiva *in vitro* de la composición de hialuronano acilado con las SPION

Los fibroblastos humanos primarios marcados con DiO (verde) y las células tumorales HT-29 marcadas con DiI (rojo) estaban en la relación de 3:1 y la concentración total de 50,000 células/pocillo sembradas en los pocillos de un panel de 24 pocillos en 1 ml de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut). Después de alcanzar una confluencia mínima del 80 % de la monocapa celular, se trataron las células con una solución de 200 µg/ml de la composición con las SPION del Ejemplo 12. Después de 72 horas de incubación, se tomó una imagen de las células por medio de un microscopio de fluorescencia Nikon Ti-Eclipse (Figura 7).

Para una explicación del posible mecanismo de la diferente actividad frente a las células de control y las células tumorales, se analizó la expresión del receptor CD44 para hialuronano por medio de citometría de flujo en células NHDF, MCF-7 y MDA-MB-231. Después de alcanzar el 80 % de confluencia, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con un anticuerpo antiCD44-FITC, después de la incubación se lavaron 2 veces de nuevo con PBS y se analizaron en un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Los resultados se indican como intensidad de fluorescencia (RFU) (Figura 8).

Además, para las células NHDF y HT-29, se determinó el estrés oxidativo después del tratamiento con la composición del hialuronano acilado con las SPION del Ejemplo 12. Las células se cultivaron en paneles de 6 pocillos y después de alcanzar la confluencia del 80 %, se trataron con una solución de 200 µg/ml de la composición con las SPION durante 24 horas. En lo que respecta a las células de control, solamente se cambió el medio por uno nuevo sin el contenido de la composición ensayada. Después de la incubación, se lavaron las células y se trataron con DCF-DA (sustancia no fluorescente que se oxida por ROS intracelular a un DCF fluorescente, la concentración final: 1 µM) durante 20 min/37 °C/en la oscuridad. Después del posterior lavado con PBS, se analizaron las células en un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec). Los resultados se indican como la intensidad de la fluorescencia relativa (% del control no tratado) de DCF dentro de las células (Figura 9).

Los resultados de la Figura 7 confirman la inhibición selectiva del crecimiento de la línea tumoral HT-29, mientras que los fibroblastos de control NHDF no se ven afectados negativamente y alcanzan la confluencia. Este efecto no es causado por una inducción diferente de la formación de ROS, dicha inducción aumenta en ambos tipos de células pero aumenta al mismo nivel (Figura 9). La explicación puede ser un grado diferente de respuesta a dicho aumento de la producción de ROS en las células NHDF y HT-29.

La diferencia de actividad con respecto a las células de control y a las células tumorales no es una función de la expresión del receptor principal de superficie para hialuronano, CD44. La Figura. 8 confirma una alta expresión de CD44 en los fibroblastos de NHDF control, cuya viabilidad fue aumentada por la composición, y una baja expresión en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231, en las que se observó una inhibición significativa de la viabilidad (Figura 3)

Después de la tinción de las células (detección de la presencia de Fe por medio de azul de Prusia) incubadas con la

composición del hialuronano acilado con las SPION del Ejemplo 12, se observa una distribución diferente de los iones Fe, mientras que el Fe disuelto se detectó en las células tumorales, los agregados de hierro se detectaron en las células de control (Figura 10). Este fenómeno podría ser la causa de la actividad selectiva de la composición en las células tumorales.

5 Ejemplo 25. Preparación de una composición para una administración intravenosa.

Se añaden 650 µl de NaCl al 0,9 % estéril a 20-30 mg del hialuronano acilado con las SPION del Ejemplo 12 preparado de una manera estéril, se agita la solución de vez en cuando hasta la disolución total del liofilizado. La solución es inyectable *in vivo* sin problemas.

10 La solución preparada de este modo es estable, en lo que respecta al tamaño hidrodinámico de las partículas, durante al menos 2 días.

Ejemplo 26. Preparación de una composición para una administración intravenosa.

Se añaden 650 µl de dextrosa al 5 % estéril a 20-30 mg del hialuronano acilado con las SPION del Ejemplo 12 preparado de una manera estéril, se agita la solución de vez en cuando hasta la disolución total del liofilizado. La solución es inyectable *in vivo* sin problemas.

15 La solución preparada de este modo es estable, en lo que respecta al tamaño hidrodinámico de las partículas, durante al menos 2 días.

Ejemplo 27. Detección *in vivo* de la composición de un hialuronano acilado con las SPION

20 Se usaron ratas Lewis Brown Norway con un tumor de glioblastoma para ensayos *in vivo*. Se inocularon los tumores inyectando una suspensión de 3×10^6 células de glioblastoma en un músculo de una pata y 9 días después de que se administrara a las ratas por vía intravenosa la composición de hialuronano acilado (HAC18:1) con las SPION (750 µl de la solución en NaCl al 0,9 %, con un contenido de Fe de 1,1 mg/kg). Después se analizaron las ratas por medio de Bruker Biospec (4.7 T).

25 La acumulación de las SPION en el tumor después de la administración intravenosa de la composición se confirmó en la Figura 11, donde se detectó especialmente el oscurecimiento de los bordes del tumor. También se detectó una acumulación visible de las SPION en el hígado (Figura 12), por lo tanto, se puede usar dicha composición como un agente de contraste para el hígado.

La acumulación de las SPION se confirmó aún más después de matar a los animales sobre secciones histológicas del tumor (Figura 13) y del hígado (Figura 14), donde la presencia de Fe se detectó por coloración con azul de Prusia (manchas azules en las figuras). El color azul no se detectó en ninguna de las muestras control.

30 Ejemplo 28. Esterilización de la composición de un hialuronano acilado con las SPION por autoclavado

La esterilización de la composición preparada según el Ejemplo 12 (concentración: 30 mg/ml en NaCl al 0,9 %) se llevó a cabo en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

La solución fue estable después de la esterilización, las SPION se mantuvieron agrupadas en nanomicelas de hialuronano (Figura 15), y se mantuvieron los efectos citotóxicos selectivos con respecto a las células tumorales.

35 Se determinó la citotoxicidad sobre la línea tumoral HT-29 y sobre los fibroblastos NHDF primarios de control según el procedimiento descrito en el Ejemplo 21. La Figura 16 muestra una comparación de la composición del Ejemplo 12 antes y después de la esterilización en autoclave, la citotoxicidad selectiva frente a las células tumorales se mantuvo incluso después de la esterilización en autoclave.

Ejemplo 29. Inducción de la apoptosis en una suspensión de tumor de ratón de la línea EL4 de linfoma

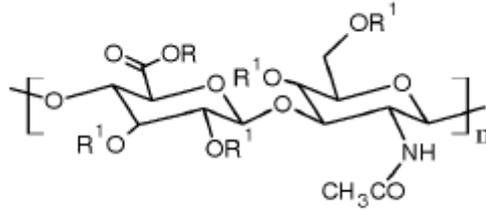
40 La línea EL4 de linfoma de ratón (utilizada para la inducción de tumores en modelos experimentales de carcinogénesis en ratones) se cultivó en el medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institut). En la fase exponencial del crecimiento, se prepararon alícuotas del cultivo celular en la concentración de 5×10^5 células/ml del medio RPMI, que se trataron con una solución a 100, 200 y 500 µg/ml de la composición con las SPION del Ejemplo 9. Después de 72 horas de incubación, se lavaron las células y se colorearon específicamente por medio de marcadores fluorescentes de la muerte celular (yoduro de propidio, AnnexinV-FITC), que posteriormente se detectaron en un citómetro de flujo MACSQuant (Miltenyi Biotec).

45 En las figuras 17A-C, hay una inducción clara de la apoptosis (la población celular en el cuadrante inferior derecho, Figura 17B) y un ligero aumento de la inducción de la necrosis (cuadrante superior izquierdo/derecho, Figura 17B) después del tratamiento con una solución de 100 µg/ml de la composición con las SPION del Ejemplo 12. La representación de las células vivas, apoptóticas y necróticas después del tratamiento por la composición en las concentraciones individuales se representa en el gráfico (Figura 17C).

50

REIVINDICACIONES

1. Una composición antitumoral basada en un derivado acilado C₆-C₁₈ de ácido hialurónico según la fórmula general (I)



(I)

5 donde R es H⁺ o Na⁺, y donde R¹ es H o -C(=O)C_xH_y o -C(=O)CH=CH-het, donde x es un número entero dentro del intervalo de 5-17 e y es un número entero dentro del intervalo de 11-35 y C_xH_y es una cadena C₅-C₁₇ lineal o ramificada, saturada o insaturada y het es un residuo heterocíclico o heteroaromático, que contiene opcionalmente átomos de N, S u O, en donde al menos en una unidad repetitiva uno o más R¹ es -C(=O)C_xH_y o -C(=O)CH=CH-het, y donde n está dentro del intervalo de 12 a 4000,

caracterizada porque

10 contiene además nanopartículas inorgánicas con el estabilizante ácido oleico, en donde las nanopartículas inorgánicas se seleccionan del grupo que consiste en nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de conversión ascendente o nanopartículas de óxido de zinc, especialmente nanopartículas superparamagnéticas.

15 2. La composición antitumoral según la reivindicación 1, caracterizada porque el hialuronano acilado es un derivado acilado C₆-C₁₈ de ácido hialurónico que tiene enlaces saturados e insaturados, especialmente derivado de ácido hialurónico acilado C_{18:1}.

3. La composición antitumoral según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el hialuronano acilado sirve como vehículo de nanopartículas inorgánicas.

4. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque las nanopartículas inorgánicas son nanopartículas superparamagnéticas.

20 5. La composición antitumoral según la reivindicación 4, caracterizada porque comprende nanopartículas superparamagnéticas basadas en óxidos de hierro, donde la cantidad de Fe en la composición es 0,3-3 % en peso, preferiblemente 1,0 % en peso.

25 6. La composición antitumoral según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, caracterizada porque contiene nanopartículas superparamagnéticas que tienen un tamaño de 5 a 20 nm, preferiblemente de 5 a 7 nm, más preferiblemente de 5 nm.

7. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque contiene nanopartículas de óxido de zinc en la cantidad de 0,3 a 3 % en peso.

30 8. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque contiene nanopartículas de conversión ascendente en una cantidad tal que el contenido total de elementos de tierras raras en la composición es de 0,3 a 3 % en peso.

9. La composición antitumoral según la reivindicación 8, caracterizada porque contiene nanopartículas de conversión ascendente que contienen Er, Yb e Y.

10. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales tanto adherentes como en suspensión.

35 11. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales derivadas de carcinoma colorrectal y adenocarcinoma, carcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de mama, preferiblemente carcinoma colorrectal y adenocarcinoma.

12. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para uso en una detección *in vivo* de la acumulación de la composición en el cuerpo, especialmente en un tumor y en el hígado.

40 13. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, para uso en una detección *in vivo* de formaciones patológicas en el cuerpo, especialmente tumores.

14. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque es aplicable en una formulación para administración parenteral o local.
15. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque contiene además otros aditivos utilizados en composiciones farmacéuticas, preferiblemente cloruro de sodio, dextrosa o sales tamponantes, y/o una sustancia medicinal, preferiblemente un citostático.
- 5
16. La composición antitumoral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque es esterilizable en la envoltura final mediante autoclave.
17. Un método de preparación de la composición definida en las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se prepara una solución acuosa de un derivado acilado de ácido hialurónico, después se añaden partículas inorgánicas dispersadas en un disolvente haluro orgánico y estabilizadas por ácido oleico, siendo seleccionadas dichas partículas inorgánicas del grupo que comprende nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de conversión ascendente o nanopartículas de óxido de zinc, y la suspensión resultante se somete a sonicación hasta que se forma una mezcla homogénea, y después las nanopartículas inorgánicas libres se separan de las nanopartículas inorgánicas cargadas en nanomicelas por medio de centrifugación y una filtración posterior.
- 10
18. El método según la reivindicación 17, caracterizado porque el filtrado se liofiliza posteriormente, o porque el filtrado se esteriliza posteriormente por autoclave en la envoltura final, o porque el liofilizado se disuelve posteriormente en una solución acuosa y se esteriliza en autoclave en la envoltura final.
- 15

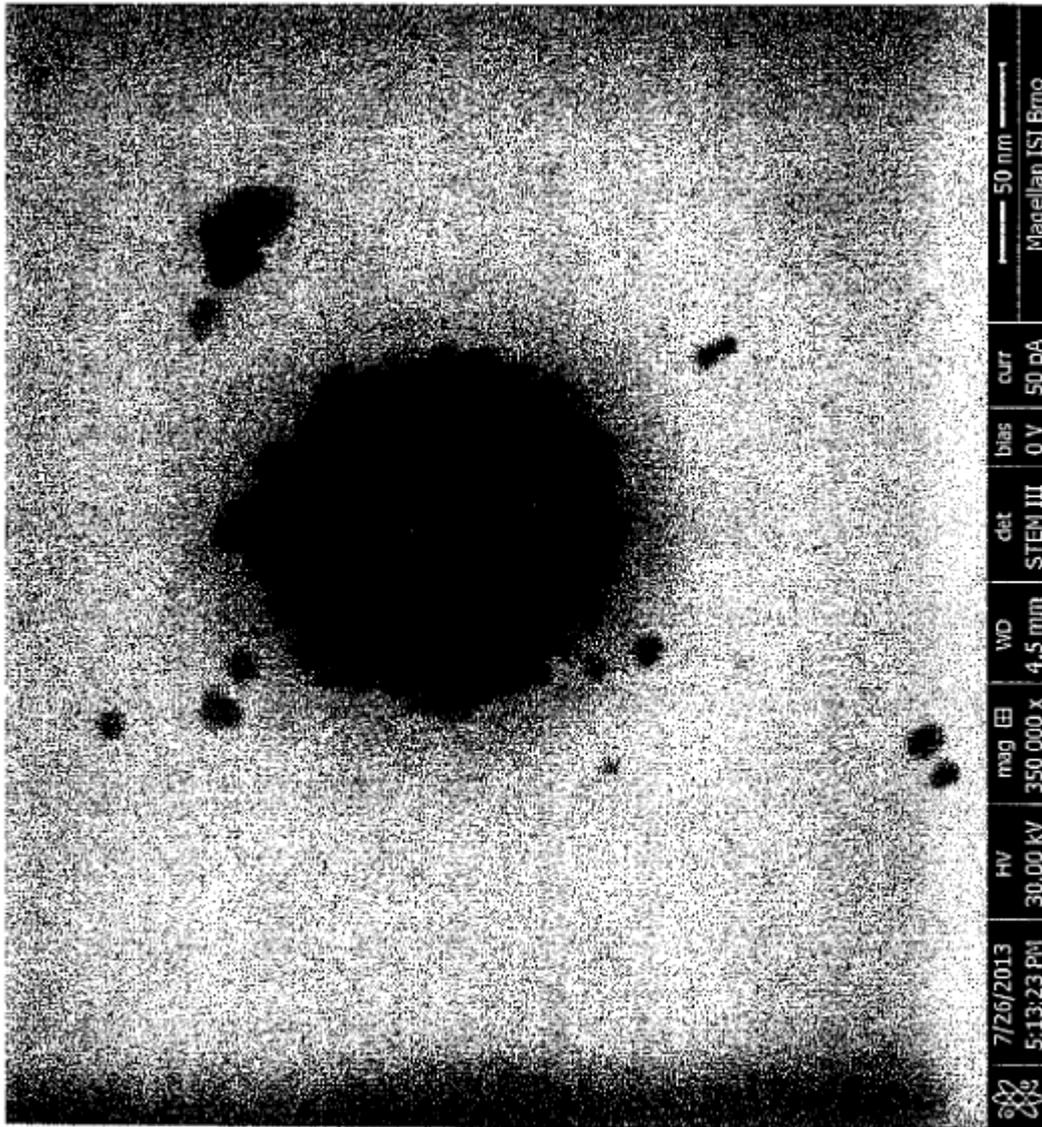


Fig 1

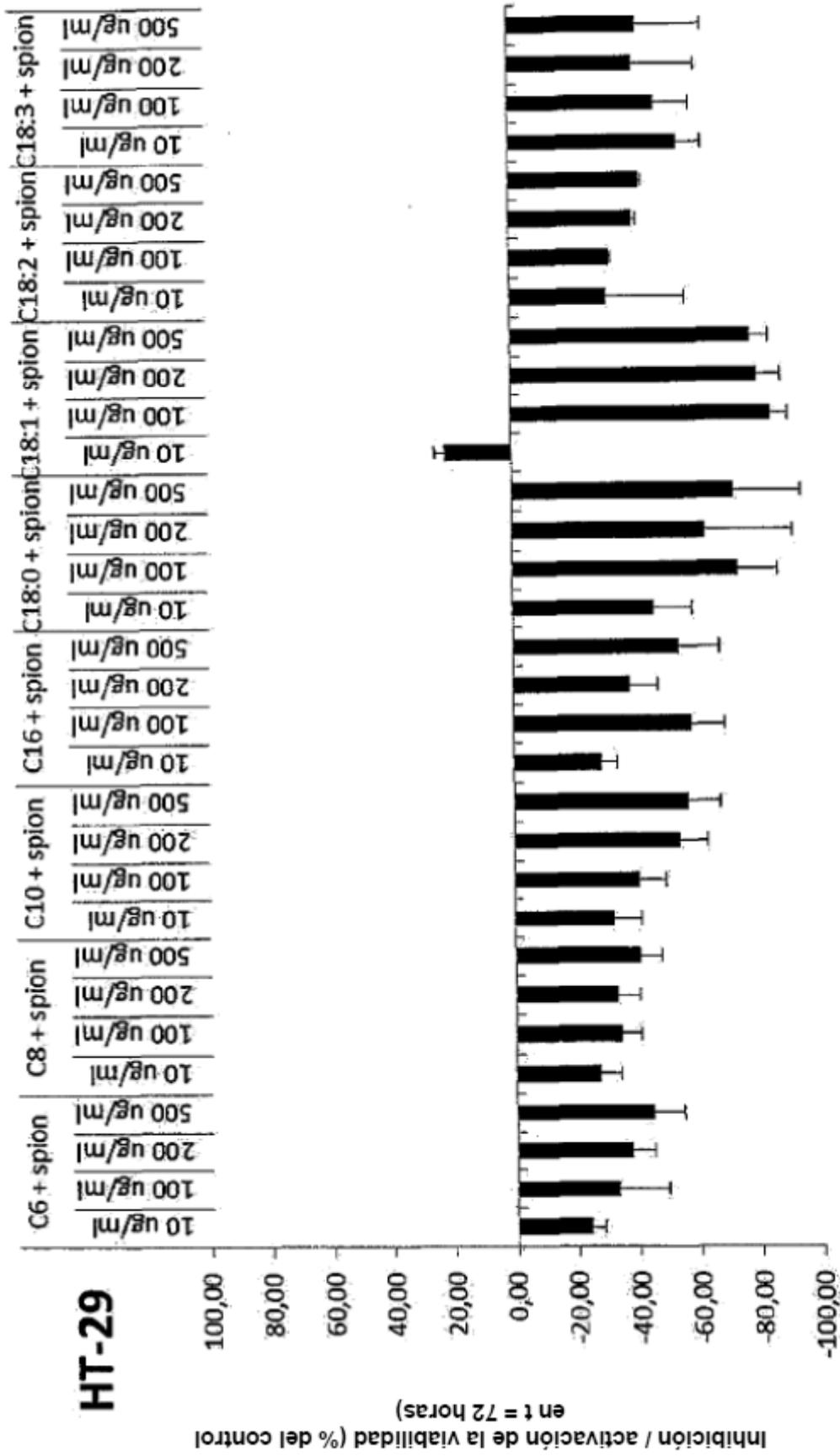


Fig 2A

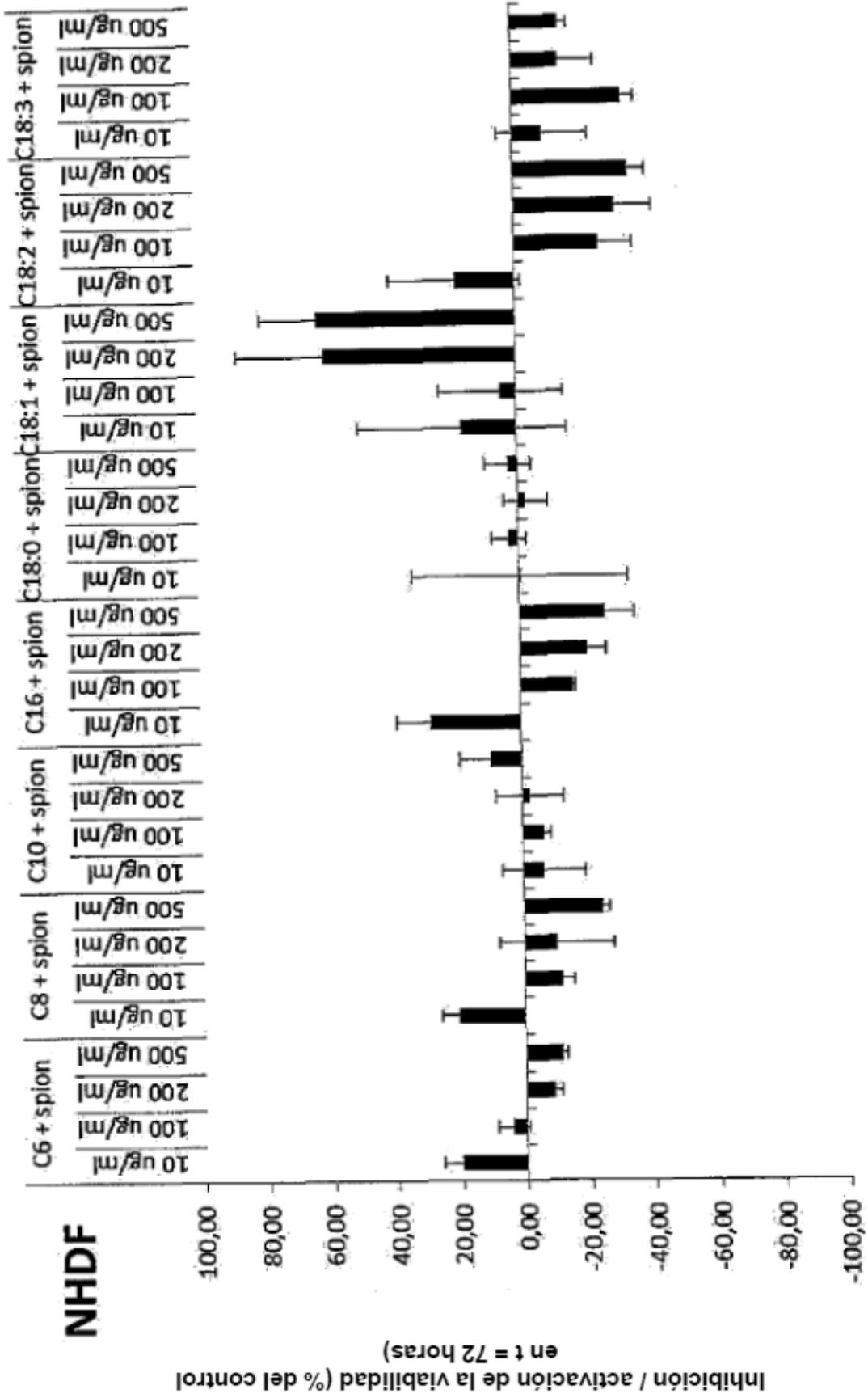


Fig 2B

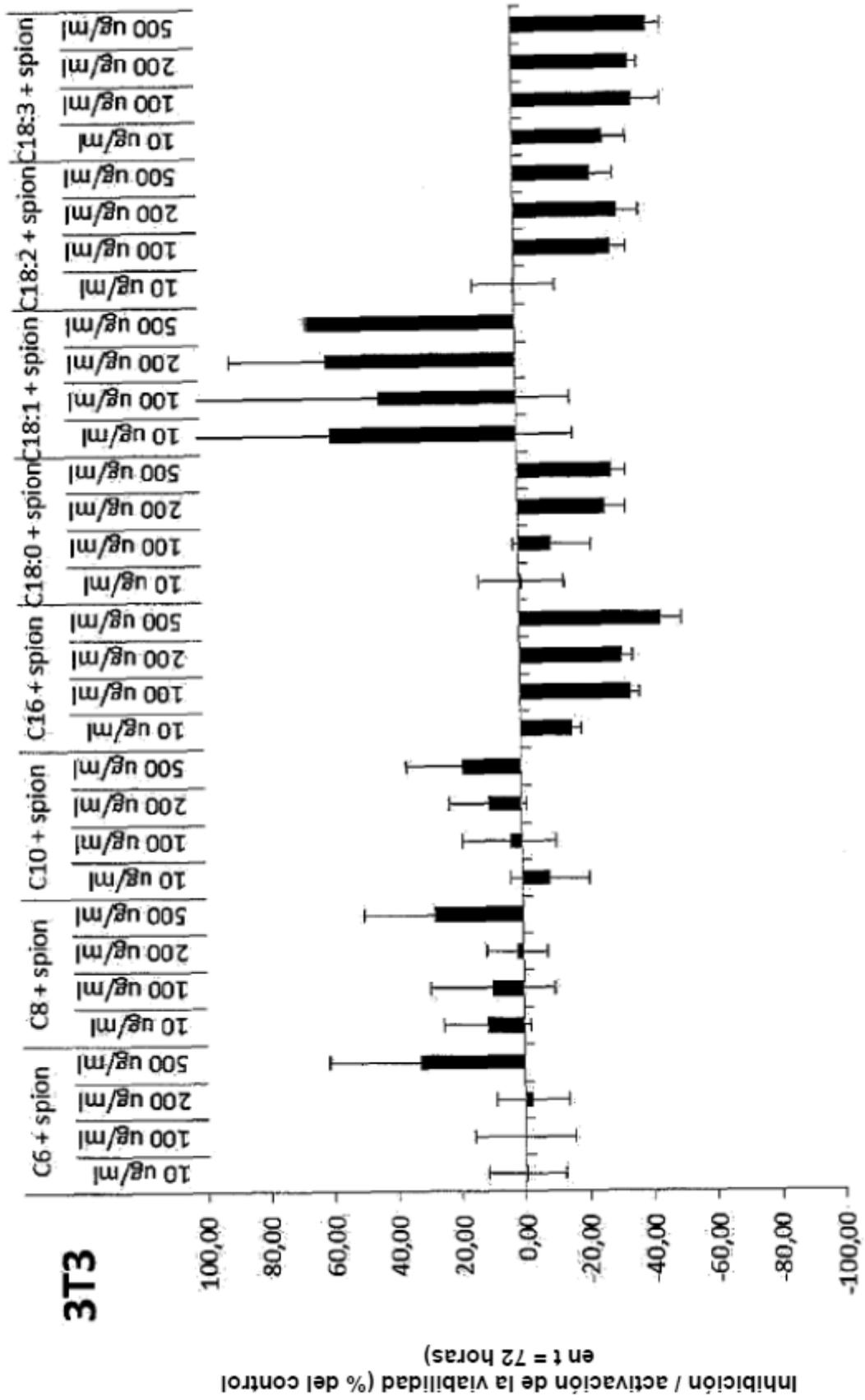


Fig 2C

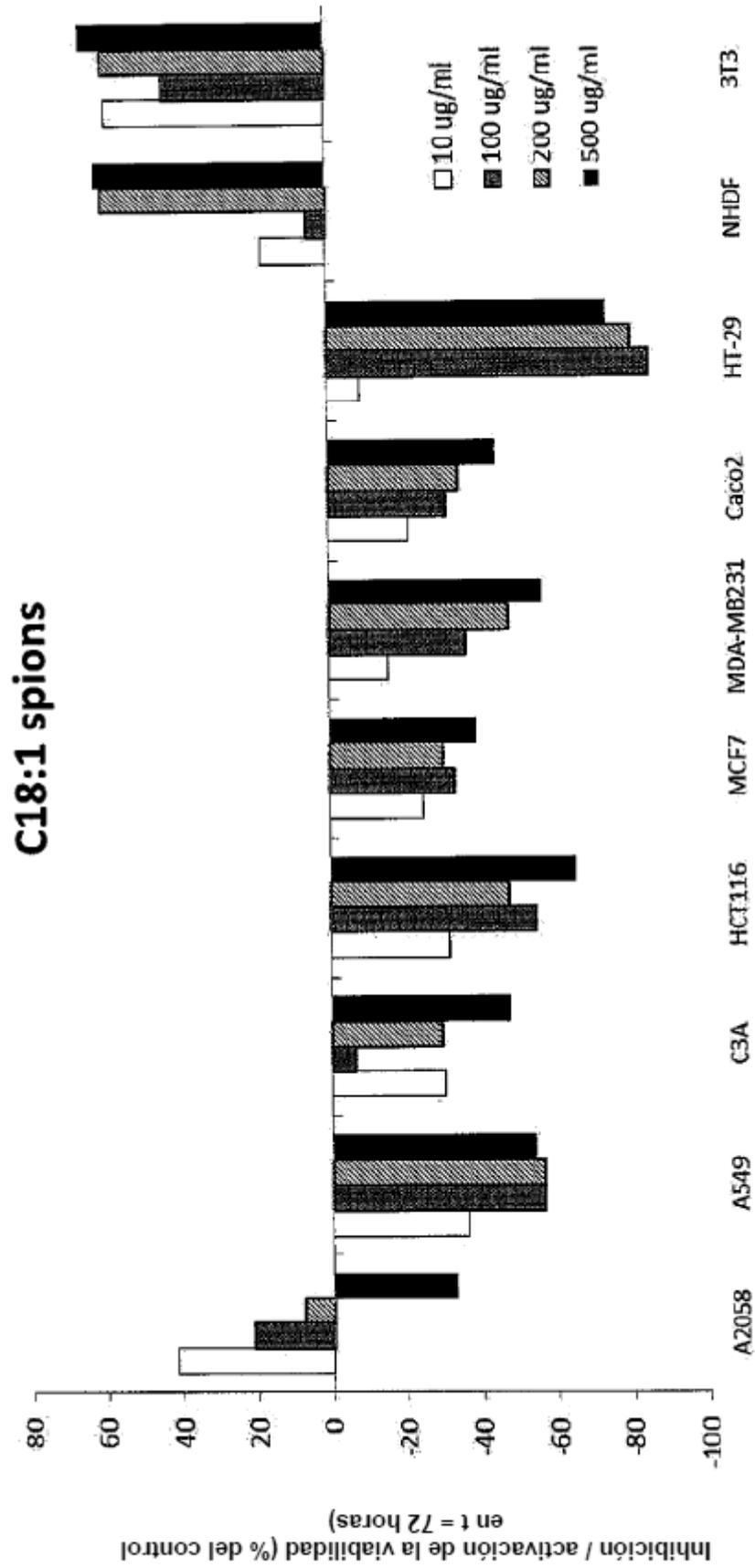


Fig 3

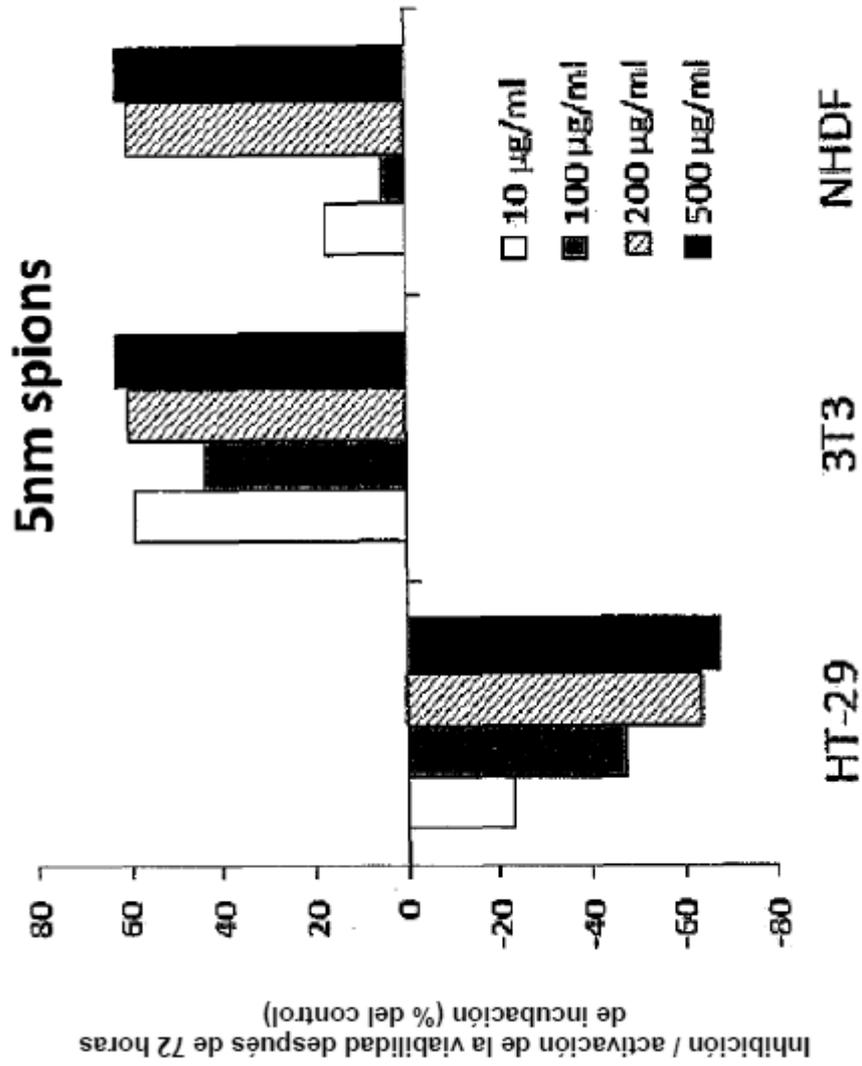


Fig 4A

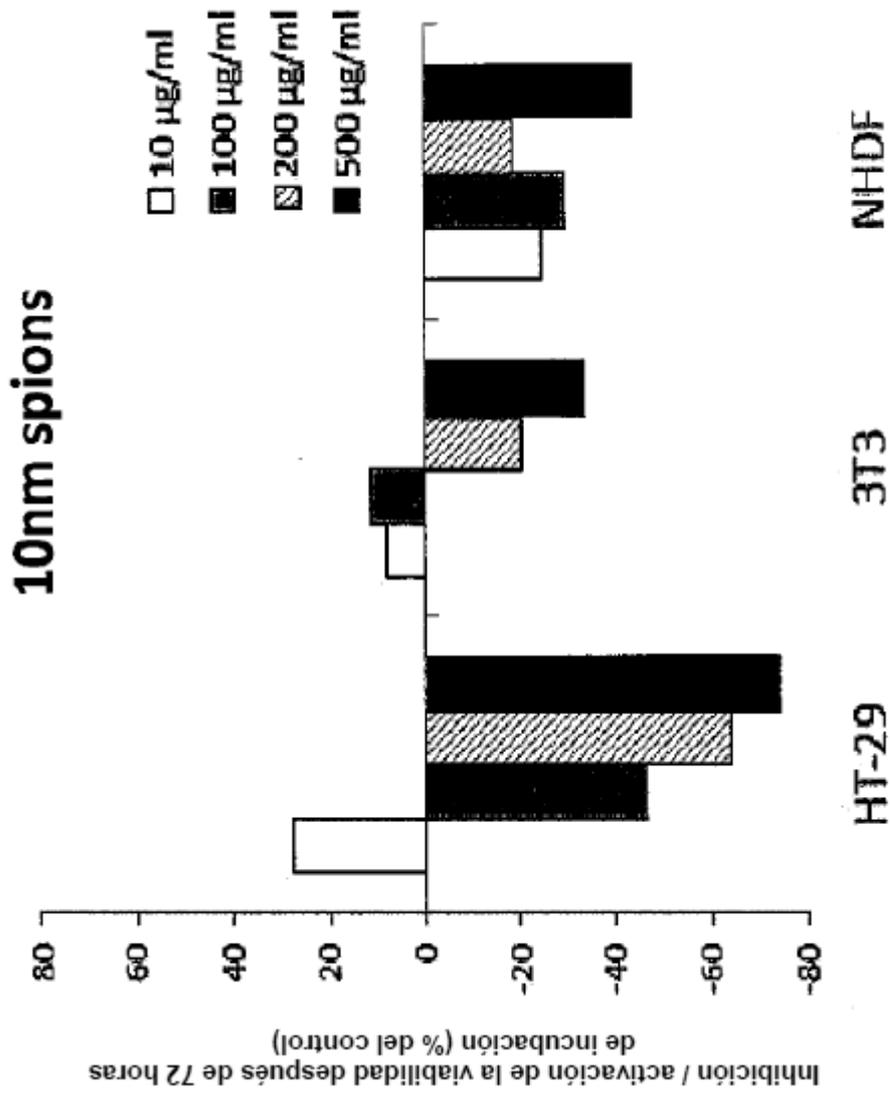


Fig 4B

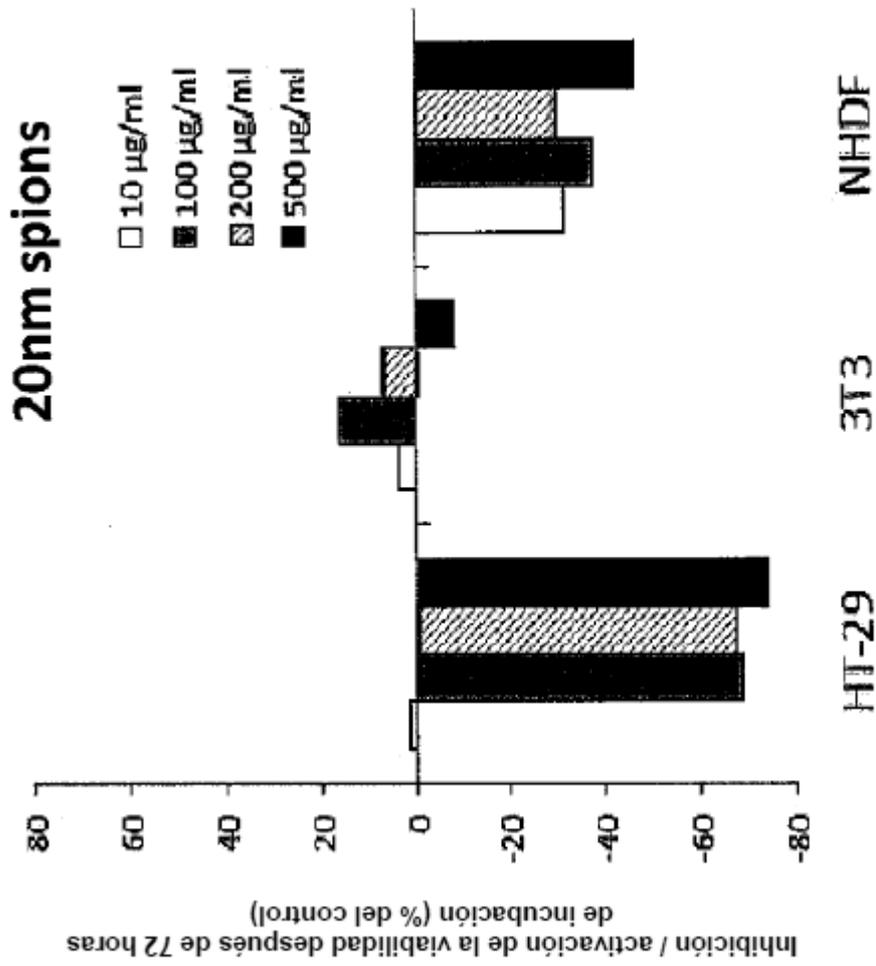


Fig 4C

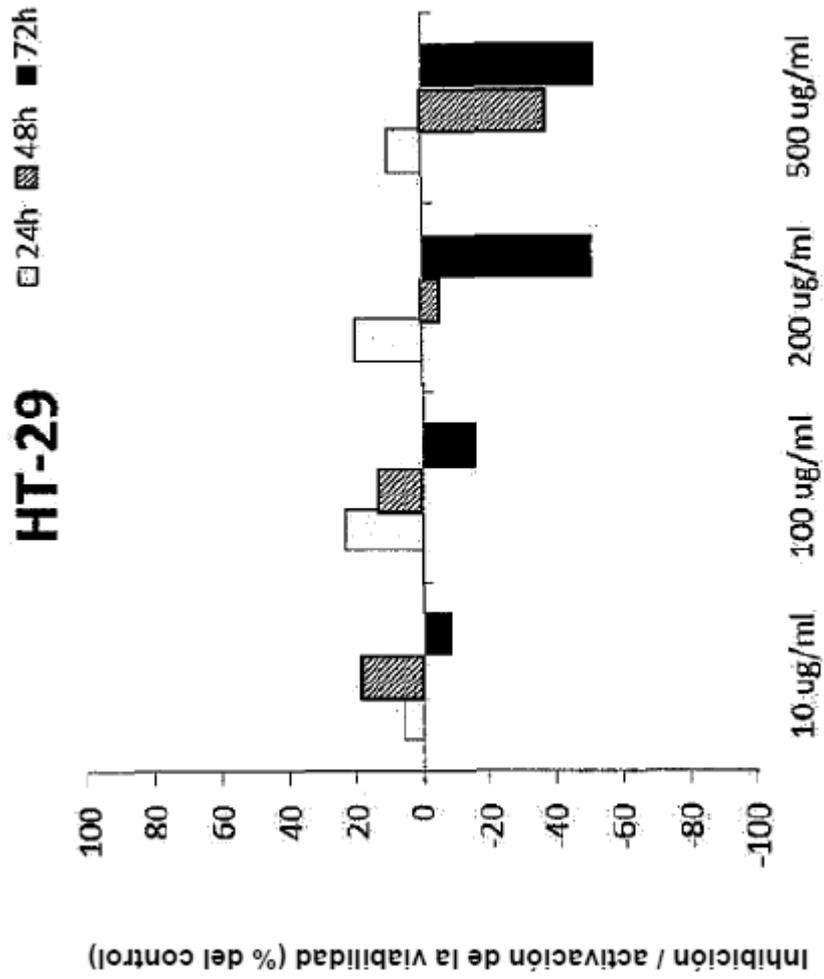


Fig 5A

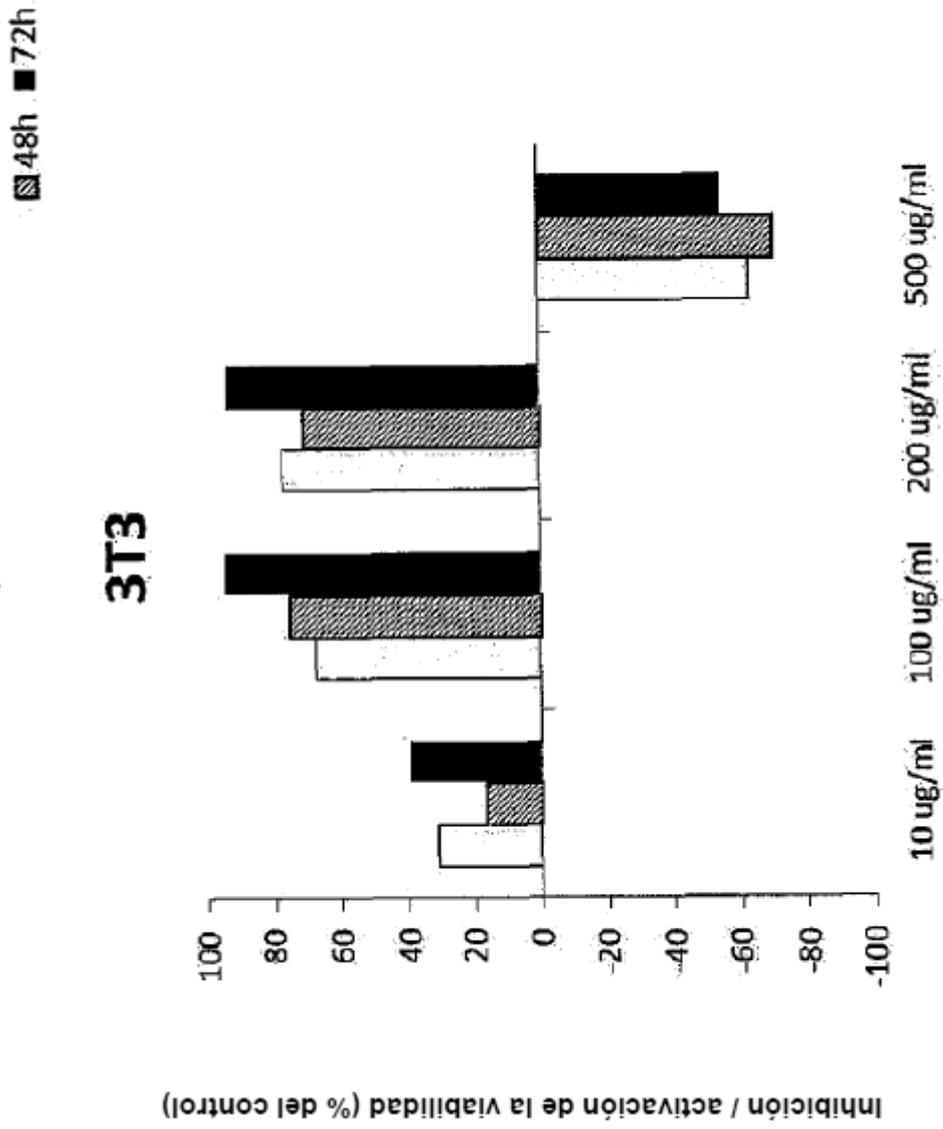


Fig 5B

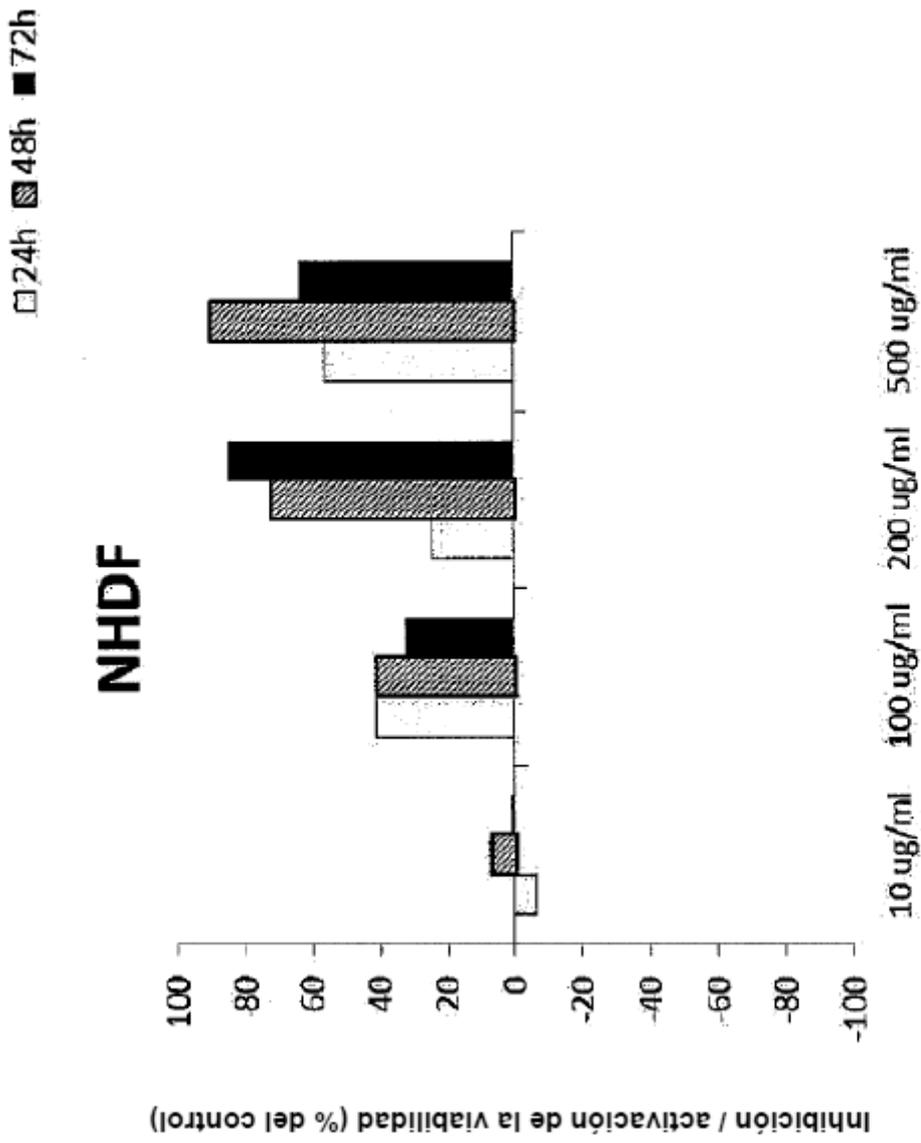


Fig 5C

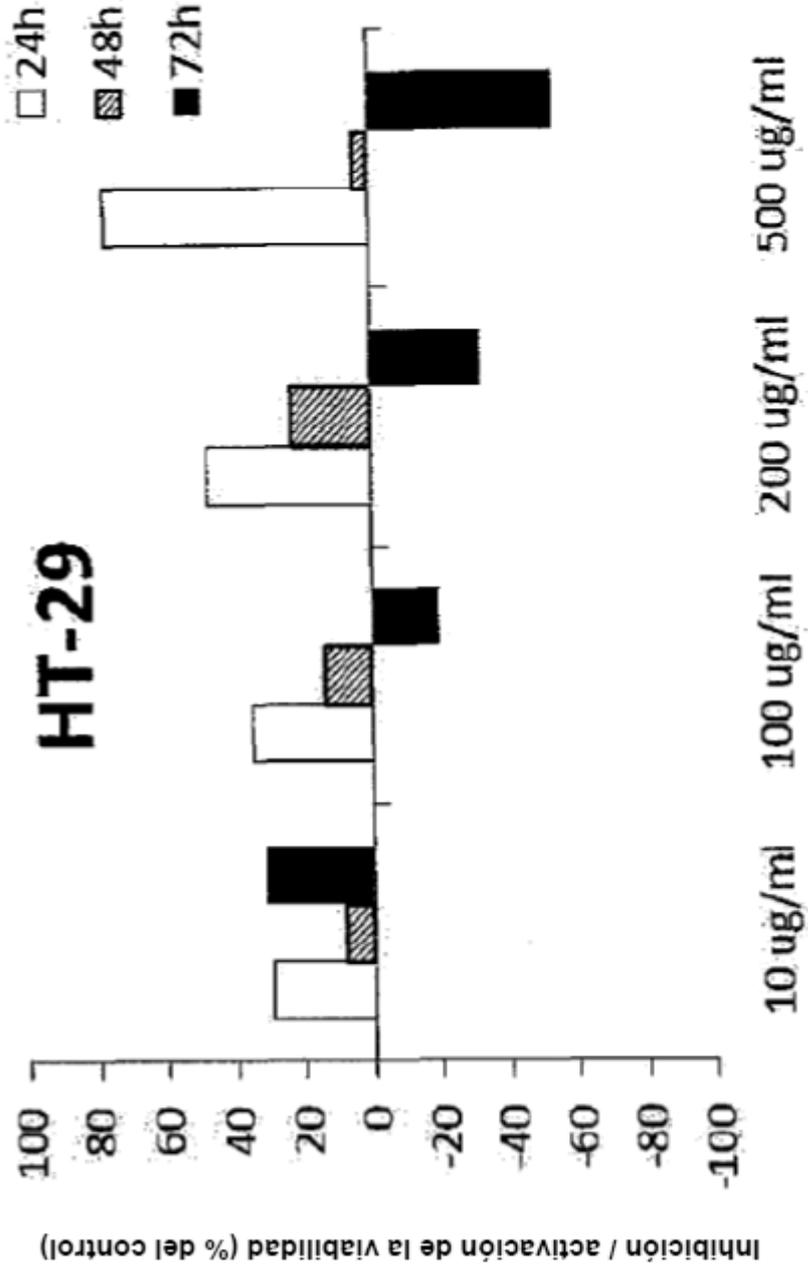


Fig 6A

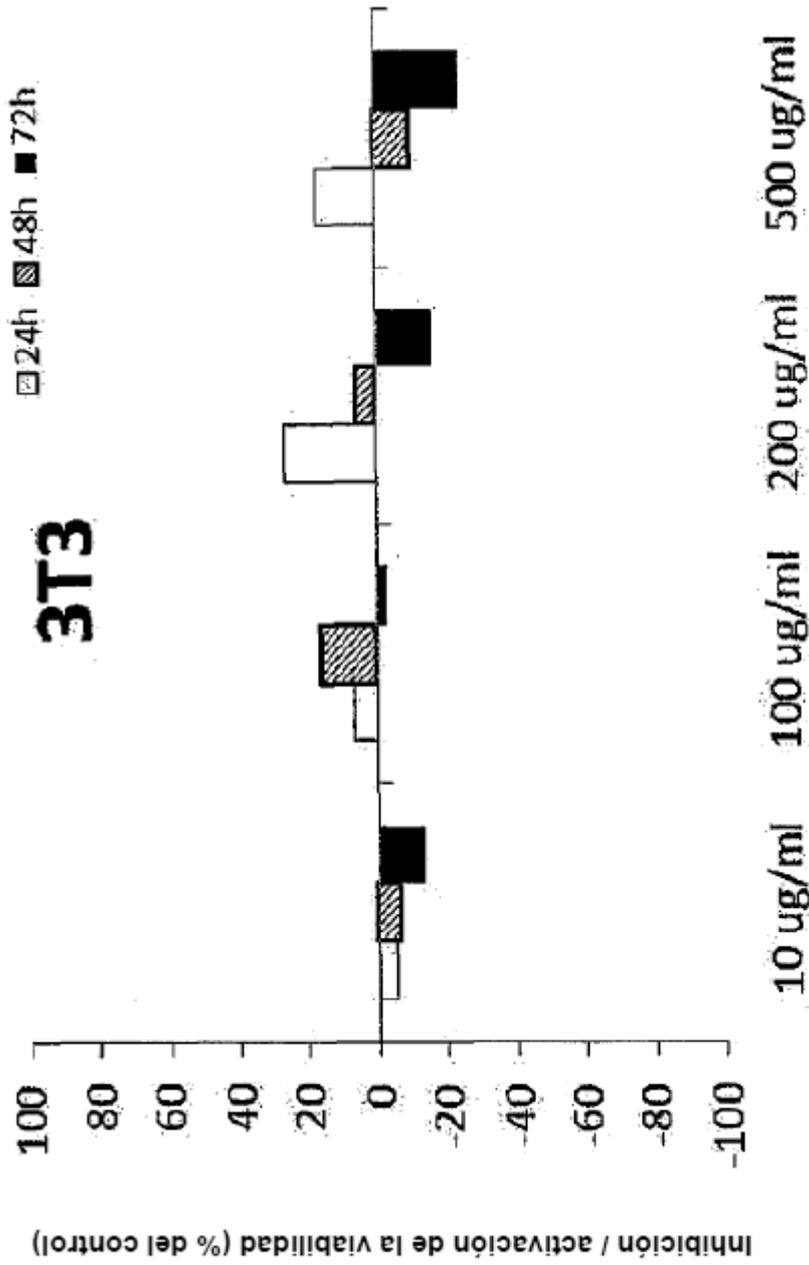


Fig 6B

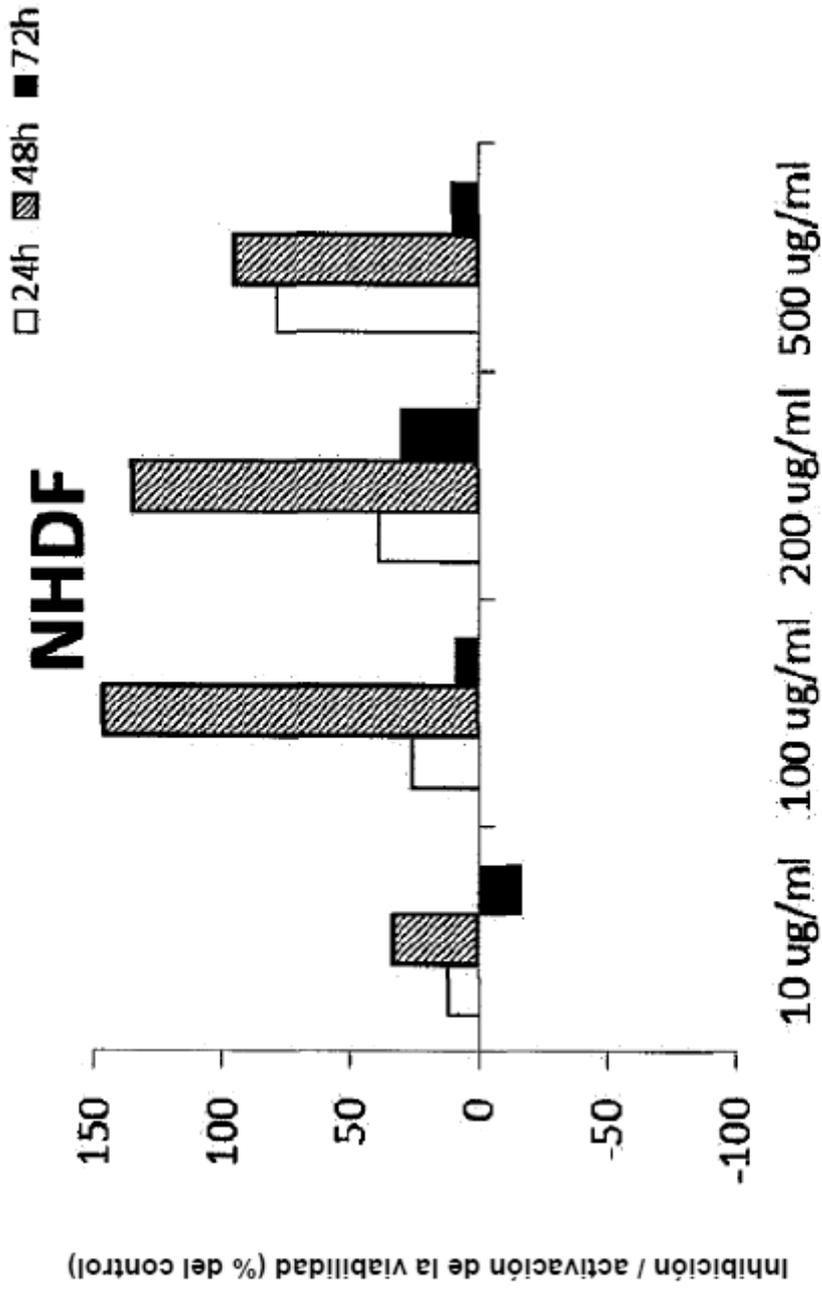


Fig 6C

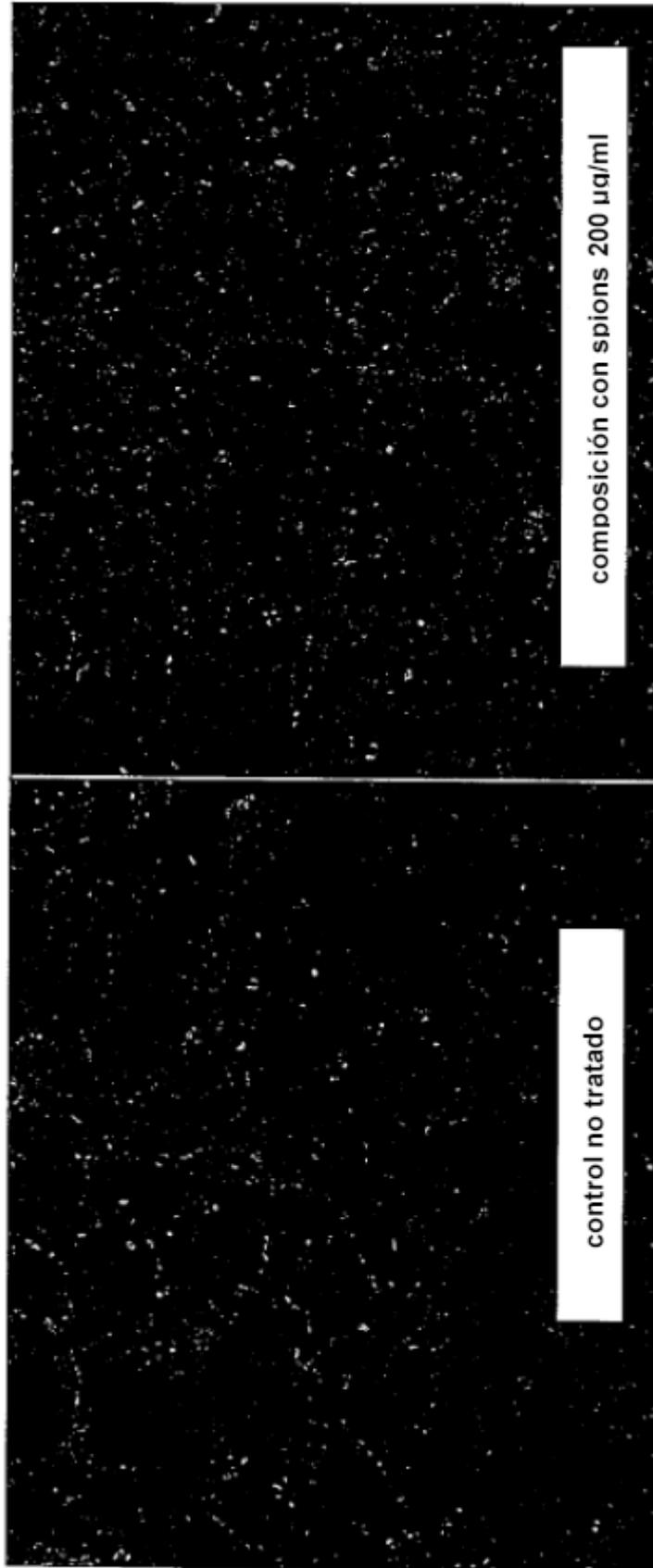


Fig 7

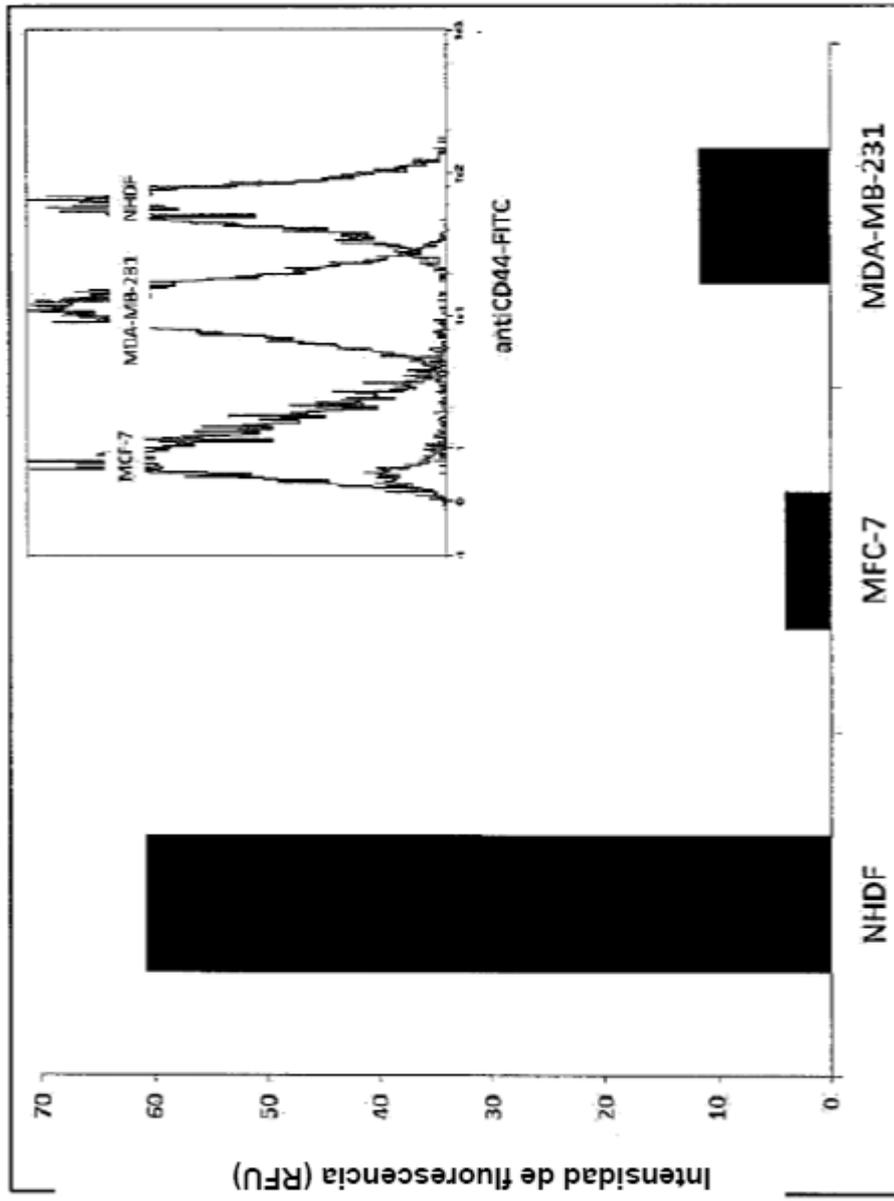


Fig 8

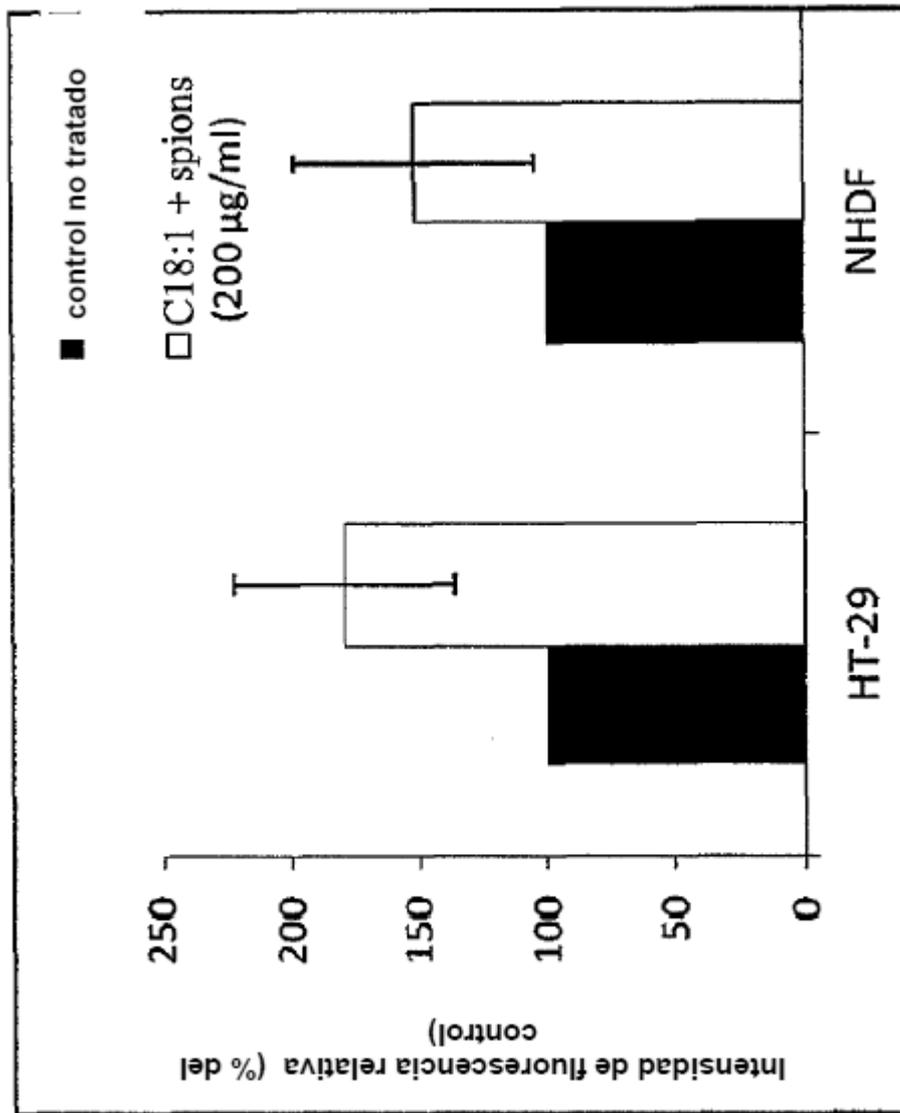


Fig 9

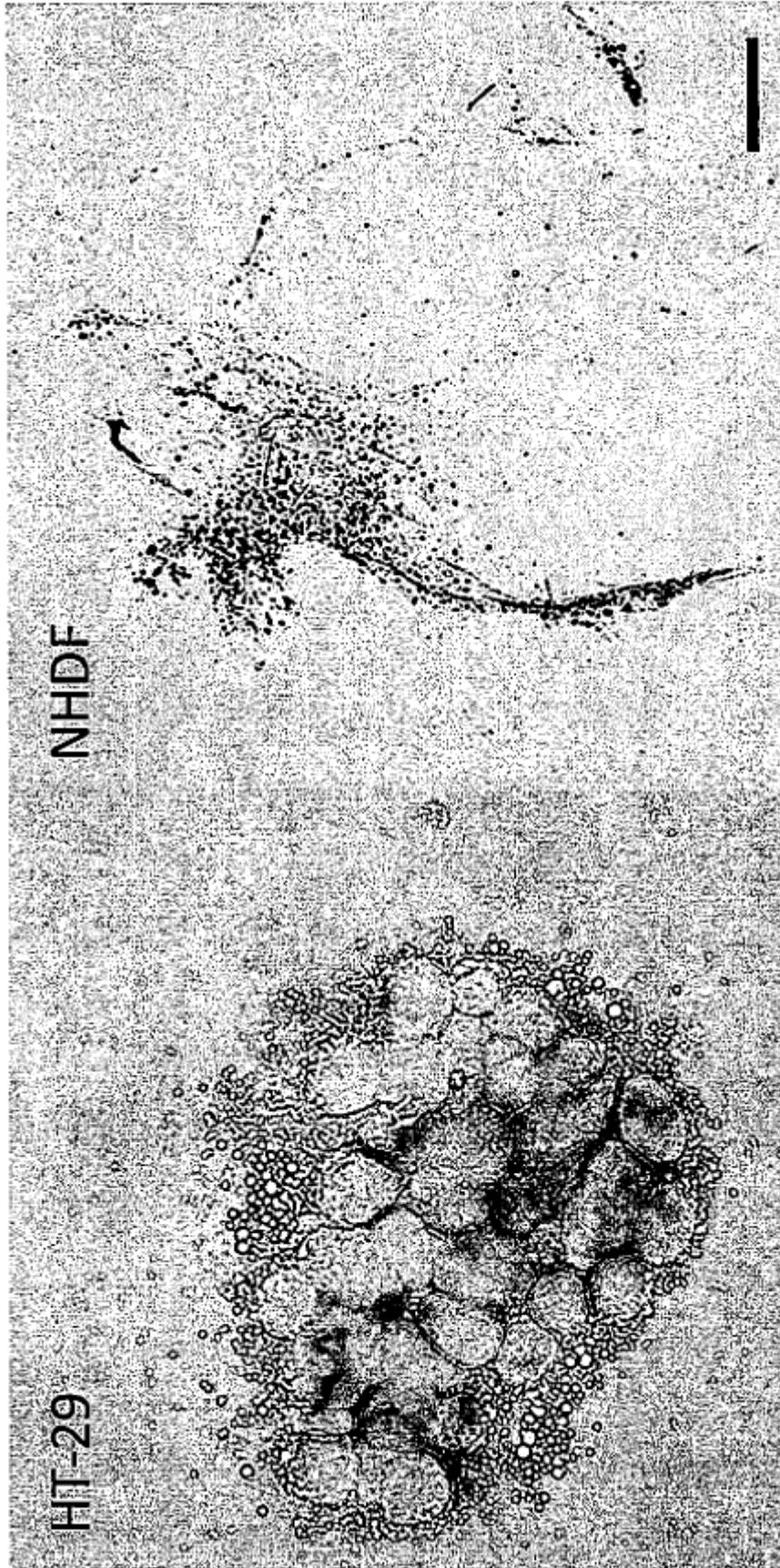


Fig 10



Fig 11



Fig 13

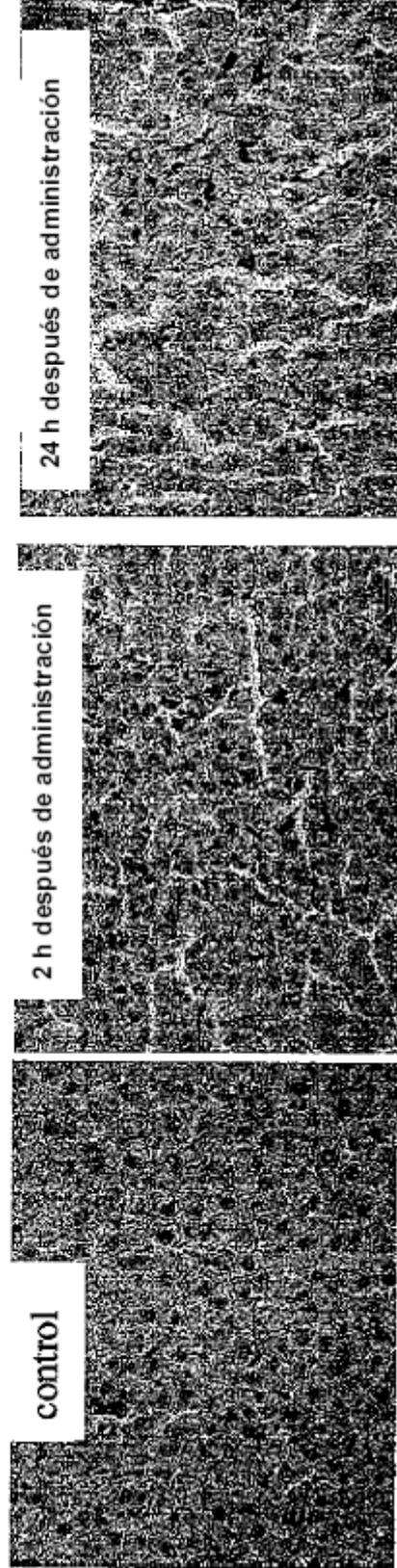


Fig 14

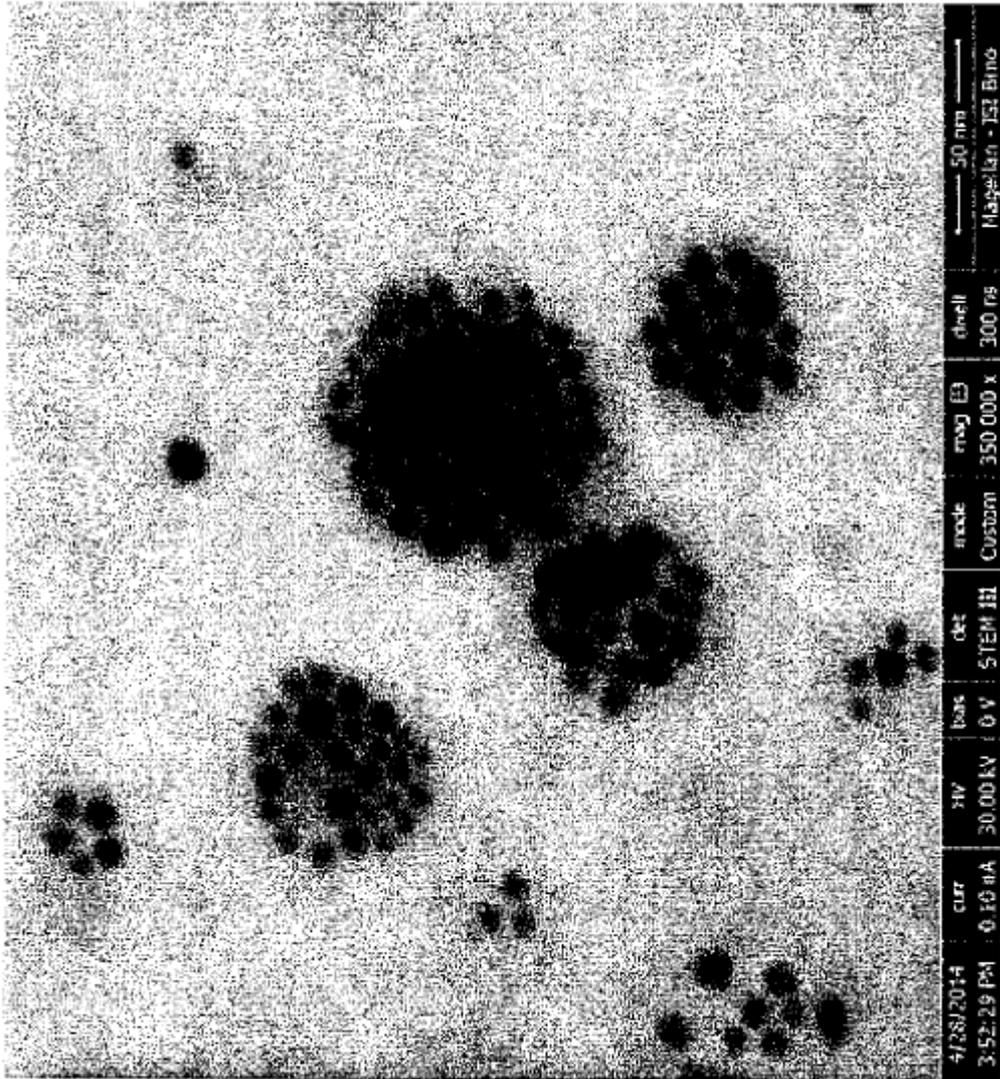


Fig 15

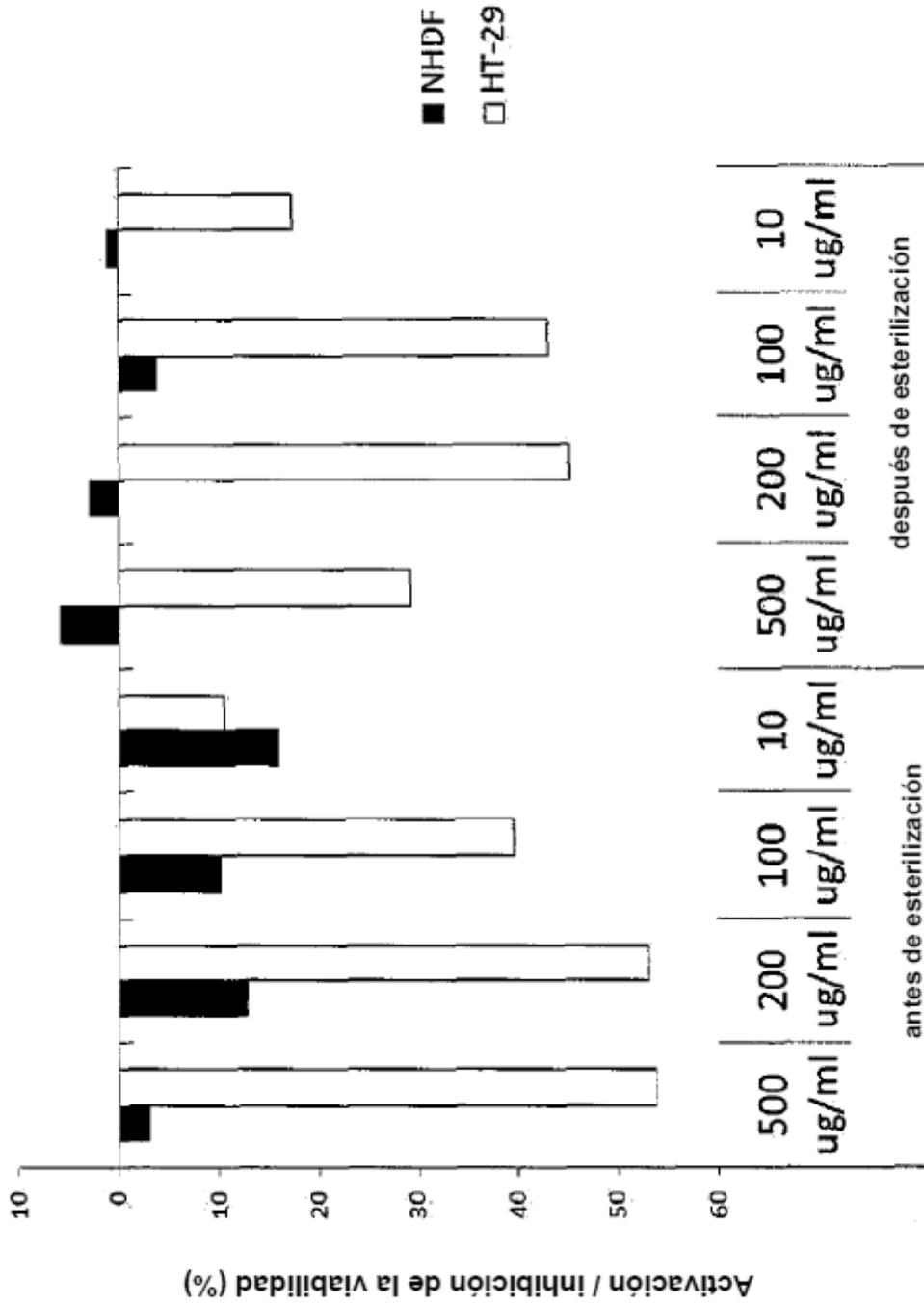


Fig 16

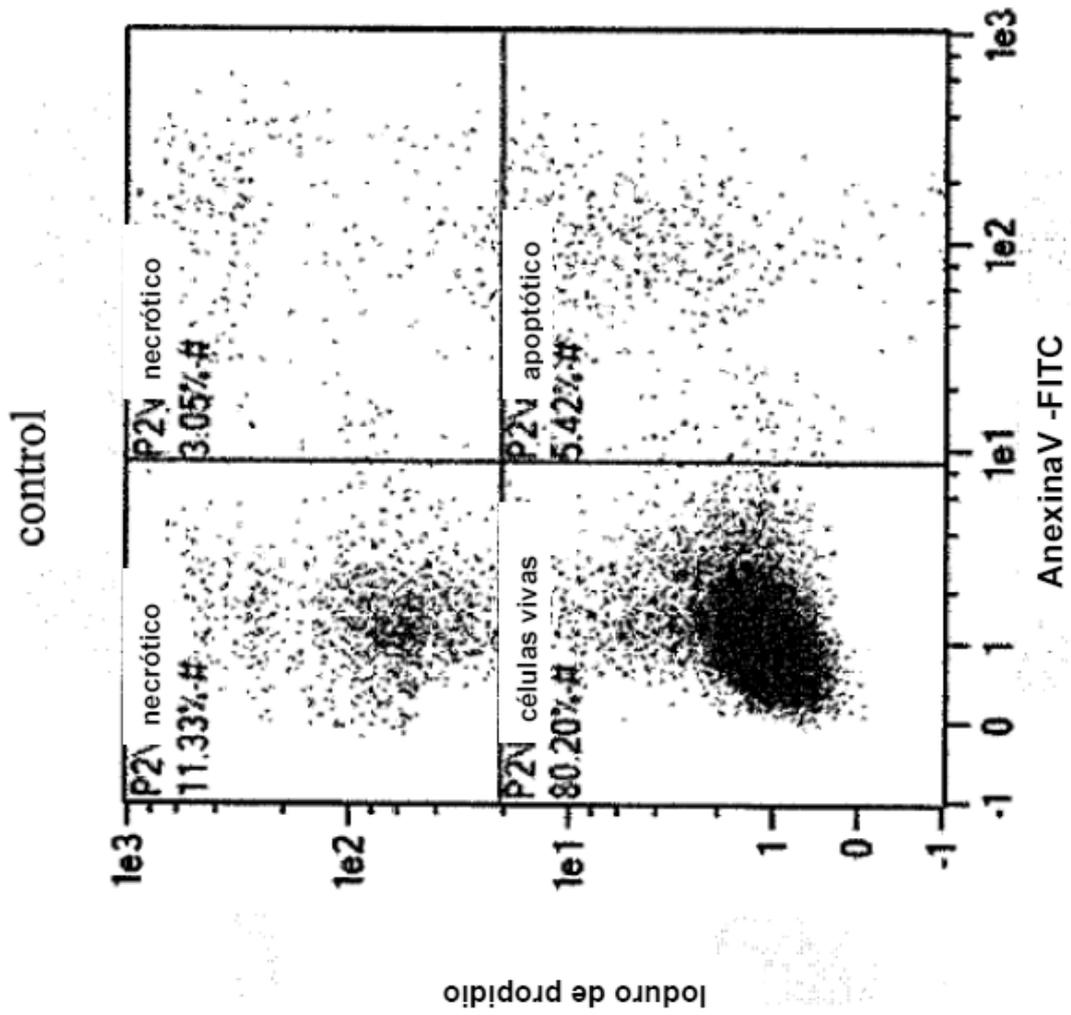


Fig 17A

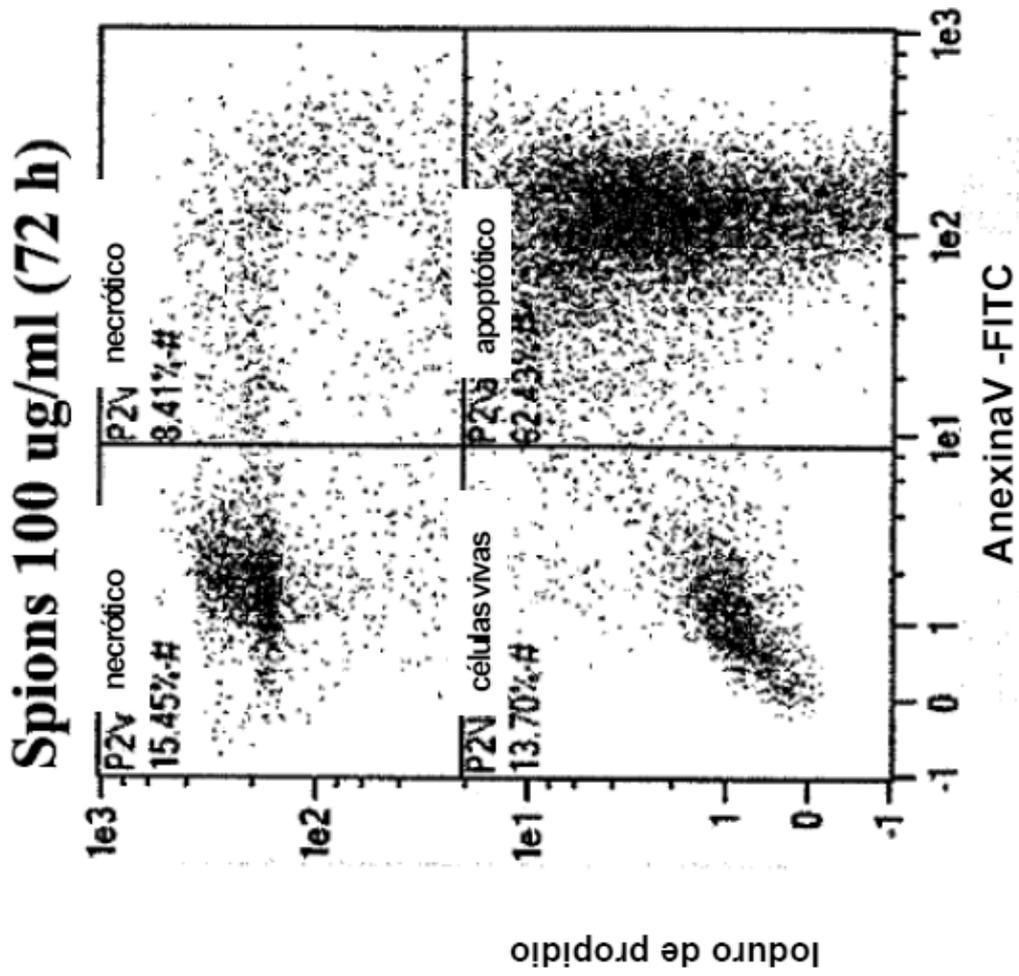


Fig 17B

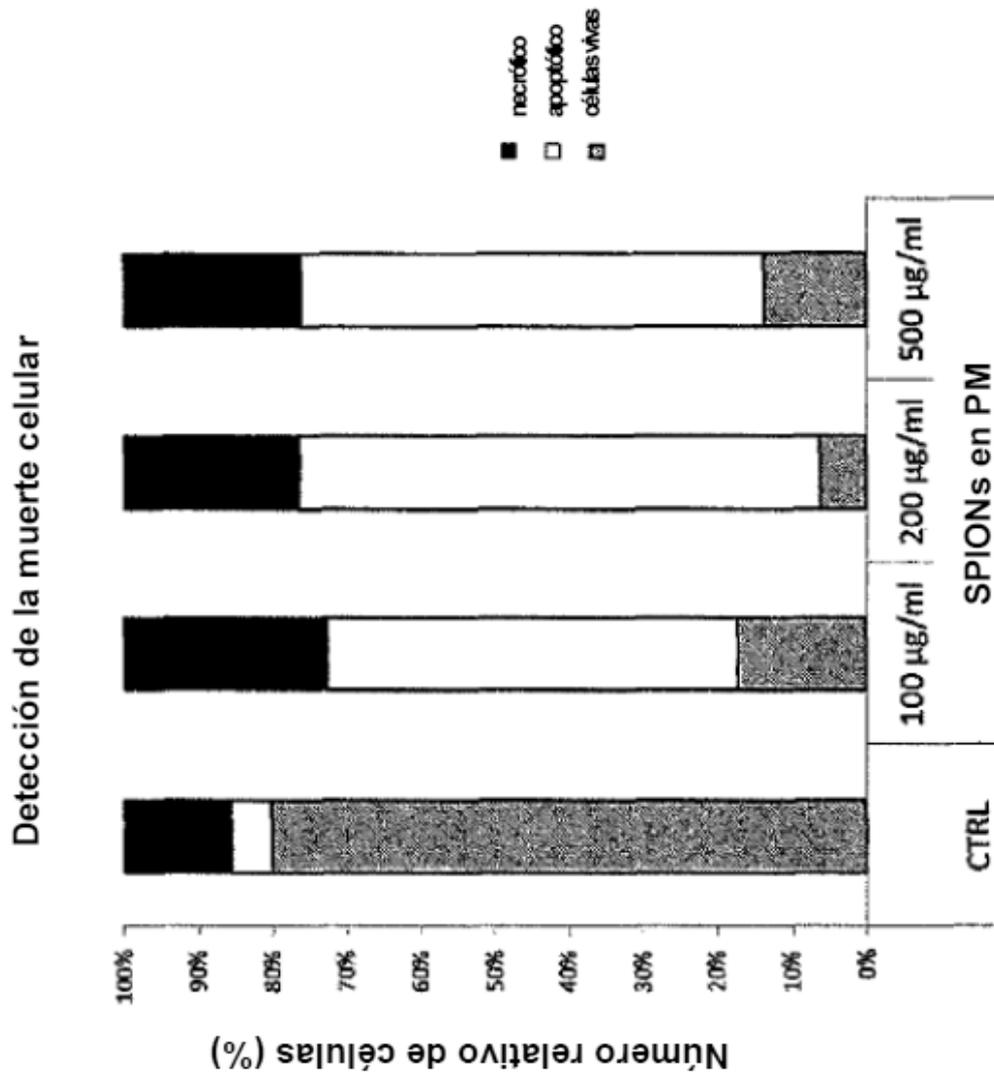


Fig 17C